

**Chemische Neuuntersuchung der Rinde von
Rhamnus alpinus ssp. fallax
Isolierung, Charakterisierung und Struktur-
aufklärung einiger Anthra- und Naphthochinone**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Holger Miething
aus Bremen
Berlin 1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548817_0016

Chemische Neuuntersuchung der Rinde von
Rhamnus alpinus ssp. *fallax*
Isolierung, Charakterisierung und Strukturaufklärung
einiger Anthra- und Naphthochinone

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Holger Miething
aus Bremen

Berlin 1984

1. Referent: Prof. Dr. R. Hänzel

2. Referent: Prof. Dr. G. Wurm

Tag der mündlichen Prüfung: 19.7.1984

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakognosie und Phytochemie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Professor Dr. R. Hänsel und Herrn Privatdozent Dr. H.W. Rauwald durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Hänsel für die Überlassung des Themas und für seine wohlwollende Betreuung sowie insbesondere für die akademische Freiheit, die er mir bei der Bearbeitung des Themas ließ. Herrn Priv.-Doz. Rauwald danke ich für die täglichen Ratschläge und Anregungen, besonders bei der Diskussion der Spektren.

Meinen Kollegen Frau B. Maertin, Herrn H.D. Just und Herrn R.Vötig danke ich ganz besonders für das überaus gute und kollegiale Arbeitsklima.

Allen übrigen Mitarbeitern am Institut möchte ich an dieser Stelle ebenfalls für die sehr gute Zusammenarbeit danken.

Ich danke Frau J. Schulz für die Ausführung der HPLC-Untersuchungen, Frau U. Ostwald, Organisch Chemisches Institut der FU Berlin, für die Aufnahme der hochaufgelösten Massenspektren, Frau G. Dreke für die Aufnahme der 250 MHz ^1H -NMR-Spektren, Herrn G. Grelbig für das Anfertigen der 60 MHz ^1H -NMR-Spektren, Herrn J. Lindemann für das Anfertigen der übrigen Massenspektren und Herrn Dr. Spraul, F. Bruker Karlsruhe für die Aufnahme des 2d NOE-Spektrums.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	8
2. Allgemeine Vorbemerkungen	10
2.1. Angaben zur Botanik und Allgemeines über die arzneiliche Verwendung von <i>Rhamnus alpinus</i> ssp. <i>fallax</i>	10
2.2. Chemische Charakterisierung der Rhamnaceen	12
2.3. Chemische Charakterisierung der Rinde von <i>Rh. alpinus</i> ssp. <i>fallax</i> hinsichtlich der bisher beschriebenen phenolischen Inhaltsstoffe (Anthra- chinone, Flavonolglykoside)	12
3. Hauptteil	14
3.1. Isolierung und Strukturaufklärung einiger lipophiler Anthra- und Naphthochinone	14
3.1.1. Extraktion und Aufarbeitung der lipophilen Fraktion	14
3.1.2. Zusammenfassendes Isolierungsschema	15
3.1.3. Allgemeine Betrachtungen zur IR- und Massenspektroskopie 1.8-dihydroxylierter Anthra- chinonaglyka	16
3.1.3.1. IR-Spektroskopie	16
3.1.3.2. Massenspektroskopie	16
3.1.4. Identifizierung von Alp I als Chrysophanol	17
3.1.5. Identifizierung von Alp II als Physcion	18
3.1.6. Identifizierung von Alp III als Emodin	18
3.1.7. Identifizierung von Alp IV als Alaternin	21
3.1.8. Charakterisierung und Identifizierung von Alp V	26

3.1.8.1.	DC-Eigenschaften von Alp V	26
3.1.8.2.	Spektroskopische Daten von Alp V	26
3.1.8.2.1.	Massenspektroskopie	26
3.1.8.2.2.	UV/VIS-Spektroskopie	27
3.1.8.2.3.	IR-Spektroskopie	28
3.1.8.2.4.	NMR-Spektroskopie	30
3.1.8.2.5.	Chemischer Abbau von Alp V	38
3.1.8.2.6.	Festlegung der Position der Methoxygruppe durch UV/VIS-Datenvergleich	39
3.1.9.	Qualitative HPLC-Untersuchung der isolierten Anthra- und Naphthochinone Alp I - Alp V Prüfung auf das Vorkommen von Aloe-Emodin und ALP VIa (=Aglykon von Alp VI)	43
3.2.	Isolierung und Strukturaufklärung von Rhamnal- pinosid (=Alp VI), dem Leitstoff der Fallax- rinde gemäß Ph. Eur. II	46
3.2.1.	Alp VI als Leitstoff: Bemerkungen zur dc Prüfungsvorschrift gemäß Ph. Eur. II	46
3.2.2.	Isolierungsschema I für Alp VI	48
3.2.3.	Optimiertes Isolierungsverfahren (Schema II) für Alp VI	49
3.2.4.	UV/VIS-Spektroskopie	50
3.2.5.	Massenspektroskopie	51
3.2.6.	IR-Spektroskopie	54
3.2.7.	¹ H-NMR-Spektroskopie	54
3.2.8.	Hydrolysebefunde von Alp VI	63
3.2.8.1.	Untersuchung des Zuckeranteils von Alp VI	64

	Seite
<u>Exkurs</u> : Biochemie der Apiose	66
3.2.8.2. Zur Konfiguration der Apiose in Alp VI	
3.2.8.3. ^1H -NMR-Spektroskopie der Aglykonkomponente von Alp VI	71
3.2.9. UV/VIS-Analyse verschieden substituierter Anthraderivate	74
3.2.10. NOE-Experiment	77
3.3. HPLC-Nachweis und -Gehaltsbestimmung von Rhamnalpinosid (=Alp VI), dem Leitstoff der Fallaxrinde gemäß Ph. Eur. II	80
<u>Exkurs</u> : Biosynthese der Anthra- und Naphthochinone -Rubiaceentyp, Emodintyp, 8-Methylanthra-chinontyp-	82
4. Experimenteller Teil	86
4.1. Allgemeine Angaben	86
4.1.1. Chromatographie	86
4.1.2. Spektroskopie	87
4.1.3. Schmelzpunktsbestimmung	88
4.1.4. Bestimmung der optischen Drehung	88
4.1.5. Bestimmung des pH-Werts	88
4.1.6. Gefriertrocknung	89
4.2. Isolierung von Alp I - Alp VI	89
4.2.1. Herkunft der Droge	89
4.2.2. Isolierung der Substanzen Alp I - Alp V	89
4.2.3. Isolierung der Substanz Alp VI	90
4.3. Eigenschaften der Substanzen Alp I - Alp VI	92
4.3.1. Alp I = Chrysophanol	92

4.3.2.	Alp II = Phycion	93
4.3.3.	Alp III = Emodin	93
4.3.4.	Alp IV = Alaternin (=2-Hydroxyemodin)	94
4.3.5.	Alp V = 2-Methoxystypandron	94
4.3.5.1.	Etherspaltung von Alp V zu Alp Va	96
4.3.5.2.	Alp Va = 2-Hydroxystypandron	96
4.3.6.	Alp VI = Rhamnalpinosid	96
4.3.6.1.	Saure, hydrolytische Spaltung von Alp VI	98
4.3.6.1.1.	Durchführung der Reaktion	98
4.3.6.1.2.	Alp VIa (=Aglykon von Alp VI)	98
4.3.6.1.3.	Apiose (Zuckeranteil von Alp VI)	99
4.3.6.1.4.	Chemische Identifizierung der Apiose nach Sandermann ⁴² durch Umsetzung mit H_2SO_4 , Fructose und Cystein-HCl	99
4.3.6.2.	Hydrolyse der Franguline A/B	100
4.3.7.	Trennung der Franguline A u. B mittels DCCC	100
4.3.8.	HPLC-Gehaltsbestimmung von Alp VI	101
4.3.9.	Qualitativer HPLC-Nachweis der Verbindungen Alp I - V, Alp VIa und Aloe-Emodin	102
5.	Zusammenfassung und Diskussion	103
6.	Literatur	107
7.	Lebenslauf	111

1. Einleitung und Problemstellung

Die Zahl der im Handel befindlichen Drogenverfälschungen hat in den letzten Jahren in erschreckendem Ausmaß zugenommen ^{1,2}. Zu den besonders häufig verfälschten Drogen zählen die officinellen *Frangulae Cortex* und *Rhamni purshiani Cortex* (beide Ph. Eur. II), wobei im Handel meist die Rinden von *Rhamnus alpinus* ssp. *fallax* und *Rhamnus catharticus* angetroffen werden ^{1,3}. So hatten wiederholte Lieferungen von *Rhamni purshiani Cortex*, die aus dem Großhandel bezogen waren und sich alle als Verfälschungen erwiesen hatten, aktuellen Anlaß zu einer neueren morphologischen und anatomischen Untersuchung der *Rhamnus*-Rinden und ihrer Verfälschungen gegeben ⁴. Das Europäische Arzneibuch zieht zur Identitäts- und Reinheitsprüfung der officinellen *Rhamnus*-Rinden die Dünnschichtchromatographie heran. Die in den entsprechenden Monographien beschriebenen Chromatogramme hinsichtlich der als Verfälschungen angesehenen Kreuzdorn- und Fallaxrinde haben nur rein deskriptiven Charakter, d.h. es werden "Flecke" beschrieben, die auftreten müssen oder aber solche, die nicht nachweisbar sein dürfen. Diese "Empirie" ist wissenschaftlich unbefriedigend, d.h. man möchte gerne die chemische Natur der jeweils dc-georteten Substanzen kennen. Für den Fall der Kreuzdornrinde wurden in unserem Arbeitskreis die für die blaue Fluoreszenz verantwortlichen Inhaltsstoffe, die als Leitstoffe der Ph. Eur. fungieren, isoliert, charakterisiert und strukturell aufgeklärt ^{5,6,7}. Dieser Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit für den Fall der Fallaxrinde nachgegangen. Hier fordert die Prüfungsvorschrift des Arzneibuchs : nach Detektion mit methanolischer Kalilauge darf das Chromatogramm der Untersuchungslösung bei Betrachtung im Tageslicht keine rote Zone bei R_f 0.10 - 0.15 zeigen, die eine Verfälschung oder Verunreinigung der officinellen

Drogen durch die als minderwertig angesehene Fallaxrinde anzeigt. Es war daher ein Ziel dieser Arbeit, die angesprochene Leitsubstanz der Fallaxrinde zu isolieren und ihre Struktur aufzuklären. Somit will diese Arbeit einen Beitrag zur Grundlagenforschung der Arzneibuchanalytik leisten.

Ein eingehendes Literaturstudium macht darüberhinaus deutlich, daß es nach wie vor unklar geblieben ist, inwiefern Fallax- und Kreuzdornrinde überhaupt als minderwertige Anthracen-Drogen angesehen werden, zumal die Fallaxrinde wegen ihrer laxierenden Wirkung seit langem in der Volksmedizin des Balkans in Gebrauch ist ⁶⁷. Daraus ergibt sich die weitere Zielsetzung unserer Arbeiten an diesen Rhamnus-Arten, nämlich eine neue chemische Charakterisierung hinsichtlich Qualität und Quantität des Hydroxyanthracen-Spektrums, diese insbesondere im Vergleich mit der officinellen Faulbaumrinde, deren chemische Zusammensetzung weitgehend bekannt ist. Nachdem kürzlich die freien und glykosidischen Anthracenderivate der Kreuzdornrinde in unserem Arbeitskreis neu untersucht worden sind ^{5,8,9}, will die vorliegende Untersuchung einen Beitrag zur Kenntnis der lipophilen Chinonpigmente (aglykonische Anthracenderivate) der Rinde von *Rhamnus alpinus* ssp. *fallax* leisten, d.h. die mengenmäßig vorherrschenden Anthrachinone unter Heranziehung bekannter phytochemischer Arbeitsmethoden zu isolieren, deren Konstitution zu ermitteln und mit entsprechenden Inhaltsstoffen der Faulbaum- und weiterer Rhamnus-Rinden zu vergleichen und somit weitere Kenntnisse der Chemotaxonomie der Rhamnus-Arten zu gewinnen.

Die weitere Untersuchung der glykosidierten Anthracenderivate würde den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen und ist in einer nachfolgenden Arbeit vorgesehen.



2. Allgemeine Vorbemerkungen

2.1 Angaben zur Botanik und Allgemeines über die arzneiliche Verwendung von *Rhamnus alpinus* ssp. *fallax* ^{10,11}

A. Systematische Einordnung von *Rhamnus alpinus* ssp. *fallax*

Abteilung	: Spermatophyta
Unterabteilung	: Magnoliophytina
Klasse	: Magnoliatae
Unterklasse	: Rosidae
Ordnung	: Rhamnales
Familie	: Rhamnaceae
Art/Unterart	: <i>Rhamnus alpinus</i> ssp. <i>fallax</i> (Boiss.)

Nach Frohne/Jensen gliedert sich die Ordnung Rhamnales in zwei gut zu trennende Familien : Rhamnaceae und Vitaceae. Die Familie der Rhamnaceae gliedert sich in 58 Gattungen mit über 900 Arten .

B. Botanische Beschreibung von *Rhamnus alpinus* ssp. *fallax*

Gesamtpflanze ¹²

Rhamnus alpinus stellt eine polymorphe Formengruppe dar, zu der im Gebiet die beiden geographisch scheinbar gut getrennten Unterarten subsp. *eu-alpina* und subsp. *fallax* (Boiss.) Beger (=Rh. *alpina* Scop. non L. = Rh. *fallax* Boiss. = Rh. *Carniolica* A. Kern) zu stellen sind.

Rhamnus fallax Boiss. ist ein aufrechter, bis 3.5 m hoher, oft vom Grunde auf verzweigter Strauch, mit oft schon in der Jugend kahlen oder doch verkahlenden Zweigen. Die Laubblätter sind größer als bei der subsp. *eu-alpina*, an den Langtrieben meist 10 bis 13 cm, selten nur 7 cm lang, mit

(12) 15 bis 18 (20) Nervenpaaren, sind länglich-eiförmig bis breit-lanzettlich und oben fast stets zugespitzt, kahl oder verkahlend. Die Blütenstände sind 3- bis 7-zählig. Die Blüten haben eine ausgesprochene Neigung zur Zwitterigkeit. Sie sind größer als bei der subsp. eu-alpina, die männlichen 7-8 mm im Durchmesser, die weiblichen 5-6 mm. Der Griffel ist bis unter die Mitte gespalten. Die schwarzen Steinbeeren haben einen Durchmesser von 7-10 mm. Die allgemeine Verbreitung von *Rhamnus fallax* : Süd-Steiermark, Kärnten, Dalmatien, Bosnien, Herzegowina, Serbien und südliche Balkanhalbinsel bis Griechenland.

Die subsp. *fallax* kann als vikariierende Rasse der *Rh. alpina* dem illyrischen Gebirgselement zugezählt werden. Nach Beck spielt dieser "in herrlichstem Grün prangende "¹² Strauch, dessen xeromorphe Ausbildung weniger ausgeprägt als bei der westlichen subsp. eu-alpina ist, eine hervorragende Rolle im Krummholzgürtel der illyrischen Voralpen, weniger durch Bildung ausgeprägter Bestände als durch sein truppweises Auftreten.

Rindendroge ¹³

Die junge Rinde ist wie die von *Frangulae Cortex* graubraun und weist ziemlich viele hellgraue, quergestellte Lentizellen auf. Die ältere Rinde ist grau bis dunkelbraun, rissig, rauh und zum Teil borkig. An den Bruchstellen treten zahlreiche starke Fasern auf. Auf der Innenseite erkennt man je nach Alter eine gelbgrüne, gelbe oder gelbbraune Färbung. Im Gegensatz zu *Frangulae Cortex* sind Steinzellen vorhanden.²⁵

Arzneiliche Verwendung

Die Rinde von *Rhamnus alpinus* ssp. *fallax* wird in ihrem Verbreitungsgebiet als Laxans verwendet ⁶⁷.

2.2 Chemische Charakterisierung der Rhamnaceen

Neben den für viele Rhamnaceen charakteristischen Anthracen (Emodin-Typ)- und Naphthalinderivaten (Nepodin- und Sorigenin-Typ) konnten folgende Naturstoffe bzw. -klassen nachgewiesen werden ¹⁴: Flavonole (besonders Kämpferol, Quercetin und verschiedene davon abgeleitete Methylether sowie deren Glykoside), Gerbstoffe (polymere Leucoanthocyane), Alkaloide (Isochinolin-Typ sowie basische cyclische Peptide), Saponine und etherische Öle.

Das Vorkommen von Naphthochinonen wurde bisher außer in einem Vertreter der Familie Rhamnaceae nicht beobachtet. In der Wurzelrinde von *Ventilago viminalis* wurde ein Naphthochinon aufgefunden ¹⁴, das sich interessanterweise wie das in der vorliegenden Arbeit beschriebene 2-Methoxystypandron (Kap. 3.1.8.) vom 2-Hydroxyjuglon ableiten soll und Ventilagon genannt wurde, dessen genaue Konstitution allerdings noch zu ermitteln bleibt.¹⁴

2.3 Chemische Charakterisierung der Rinde von *Rhamnus alpinus* ssp. *fallax* hinsichtlich der bisher beschriebenen phenolischen Inhaltsstoffe (Anthrachinone, Flavonoglykoside)

Der Gesamtanthrachinongehalt (berechnet als 1.8-Dihydroxy-anthrachinon) liegt nach Angaben von Poethke et al.¹⁵ bei 1-3%. Andere Autoren ¹⁶ fanden im Vergleich mit *Frangulae Cortex* einen um ca. 30% höheren Gesamtanthrachinongehalt in der Fallaxrinde.

Hinsichtlich der qualitativen Zusammensetzung der Anthraglykoside bestehen nur sehr ungenaue Kenntnisse. Besonderes Interesse aus pharmazeutischer Sicht gilt den Glukofrangulinen sowie den Frangulinen; sie gelten als Hauptinhaltsstoffe der officinellen Faulbaumrinde. Verschiedene Autoren ^{15,16,17,18} haben mittels dc-Vergleichs von *Frangula*- und *Fallax*extrakten diese

Inhaltsstoffe auch in der Fallaxrinde nachweisen können, jedoch in erheblich geringerer Konzentration. Sie sind allerdings bisher aus dieser Droge noch nicht isoliert und rein dargestellt worden. Im Vergleich dazu enthält die Kreuzdornrinde nach einer Neuuntersuchung⁹ keine Glukofranguline und Franguline. Aus dem sehr komplexen Anthraglykosidspektrum konnte Weisgerber 1966¹⁸ 15 Bioside und 3 Monoside isolieren. Nach saurer Hydrolyse konnten bei den Monosiden und bei 11 Biosiden jeweils Emodin als Aglykonkomponente sowie die Zucker Glukose und Rhamnose dünnschichtchromatographisch bzw. papierchromatographisch identifiziert werden. 2 Bioside enthielten Physcion, 2 Chrysophanol als Aglykon und Glukose bzw. Glukose und Rhamnose als Zuckerbestandteile. Unter diesen Glykosiden sollten sich auch die Glukofranguline und Franguline befinden, wobei anzumerken ist, daß zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen als Zuckerkomponenten der Glukofranguline A + B Glukose und α - bzw. β -Rhamnose, der Franguline A + B α - und β -Rhamnose angenommen wurden. Spätere Untersuchungen^{19,20} ergaben jedoch für Glukofrangulin B und Frangulin B anstelle der Rhamnose die Apiose als Zuckerbestandteil. Eine genaue Untersuchung des Anthraglykosidspektrums der Fallaxrinde unter Verwendung moderner spektroskopischer Methoden steht somit noch aus. Als freie Anthrachinone konnten bisher in der Fallaxrinde dünnschichtchromatographisch unter Zuhilfenahme entsprechender Vergleichsproben Emodin, Physcion, Chrysophanol und Aloe-Emodin identifiziert werden¹⁸. Aloe-Emodin wurde von Poethke u. Behrendt¹⁵ als Inhaltsstoff der Knospen und Früchte, nicht dagegen der Rinde nachgewiesen. Charakteristisch für die Fallaxrinde im Vergleich zu den anderen Rhamnus-Rinden ist das Vorkommen des Flavonolglykosids Xanthorhamnin, bei dem es sich nach neueren Literaturangaben um ein Gemisch der Rhamninoside des Rhamnetins (=7-Methylquercetin) und des Rhamnazins (=3',7-Dimethylquercetin) handelt²¹.

3. Hauptteil

3.1. Isolierung und Strukturaufklärung einiger lipophiler Anthra- und Naphthochinone

3.1.1. Extraktion und Aufarbeitung der lipophilen Fraktion

Ca. 1000 g fein gepulverte Rindendroge gelagerter Handelsware von *Rhamnus alpinus* ssp. *fallax* wurde mit Diethylether im Soxhlet erschöpfend extrahiert. Nach Einengen i.V. wurde ca. 3% braunes, amorphes Pulver erhalten. Dieser Trockenextrakt wurde portionsweise säulenchromatographisch an Polyamid Divergan^R mit Methanol eluiert. Dabei wurden vier Fraktionen erhalten, in denen die mit den Labornamen Alp I - Alp V bezeichneten Verbindungen angereichert waren :

Fraktion	1	2	3	4
	Alp I	Alp II	Alp III u. IV	Alp V

Alp I, II und III wurden durch Säulenchromatographie an Kieselgel 60 mit Chloroform als Eluens aus den entsprechenden Fraktionen rein erhalten.

Die Reindarstellung von Alp IV erfolgte nach mehrfacher Säulenchromatographie mit Toluol als Eluens an Kieselgel 60. Alp V konnte nach Mehrfach-SC der Fraktion 4 an Kieselgel 60 mit Chloroform rein erhalten werden.

3.1.2. Zusammenfassendes Isolierungsschema

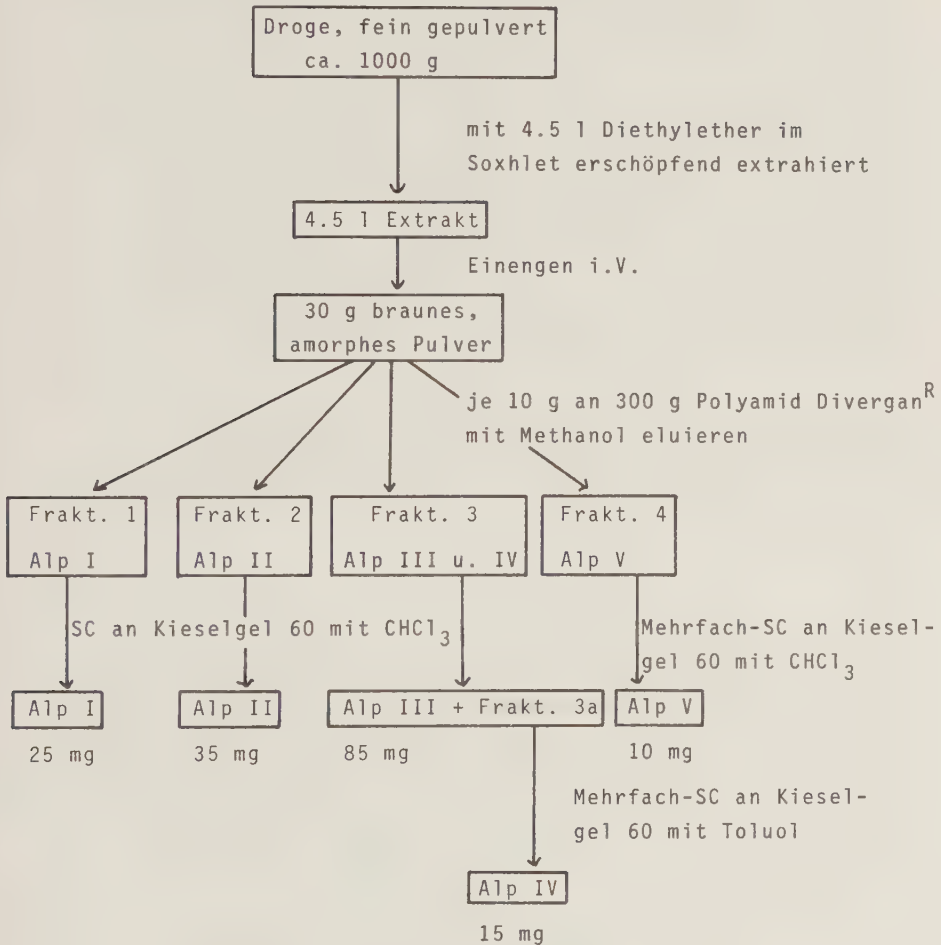


Abb. 1: Isolierungsschema der lipophilen Anthra- und Naphthochinonpigmente aus der Rinde von *Rhamnus fallax*

3.1.3. Allgemeine Betrachtungen zur IR- und Massenspektroskopie 1.8-dihydroxylierter Anthrachinonaglyka

3.1.3.1. IR-Spektroskopie ²²

Die IR-Spektren der 1.8-Dihydroxyanthrachinone vom Emodintyp sind in der Regel charakterisiert durch zwei Banden bei 1630 und 1675 cm^{-1} für die Carbonylstreckschwingungen an C-9 und C-10. Die Bande bei 1630 cm^{-1} ist aufgrund der intramolekularen Wasserstoffbrückenbildung deutlich ausgeprägter als die bei 1675 cm^{-1} . Darüberhinaus erscheinen Banden bei ca. 2850 und 2900 cm^{-1} für die chelatisierten Hydroxylgruppen an C-1 und C-8. Üblicherweise erscheinen Banden für phenolische OH-Gruppen bei Wellenzahlen 3600 cm^{-1} . Durch die intramolekularen H-Brücken, insbesondere durch Chelatisierung mit Carbonylgruppen, verschieben sich die Wellenzahlen zu 3200-2500 cm^{-1} . Zusätzlich ist im IR-Spektrum die Bande der C=C-Streckschwingung bei ungefähr 1590 cm^{-1} typisch.

3.1.3.2. Massenspektroskopie

Die Massenspektren kernmethylierter, 1.8-dihydroxylierter Anthrachinone zeigen beim elektronenstoßinduzierten Zerfall einander stark ähnelnde Fragmentierungen^{23,69}. Der Molekülpeak ist bei 70 eV im EI-MS aufgrund der base peak Intensität leicht zu identifizieren. Unter H-Abspaltung kommt es im Ring C unter Einbau der exocyclischen Methylgruppe zur Ringerweiterung $[M - 1]^+$. Daran anschließend wird drei Mal CO abgespalten $[M - 1 - 28 \text{ usw.}]^+$ bzw. es werden je nach Hydroxylierungsgrad von den einzelnen Fragmenten mehrfach OH-Gruppen abgespalten (Abb. 2).

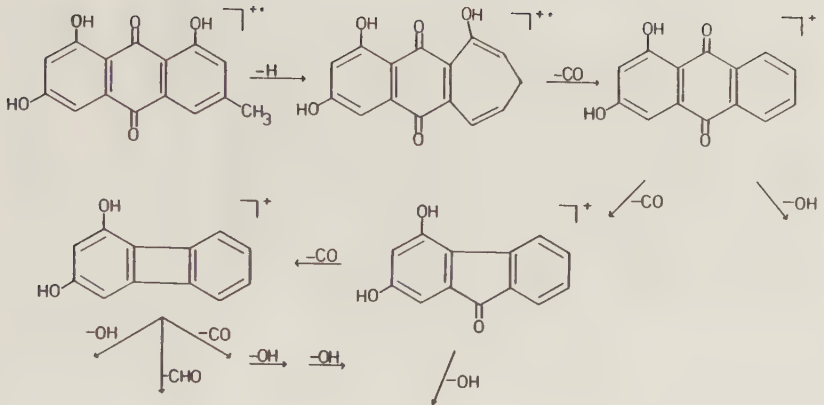
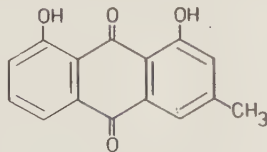


Abb. 2: Fragmentierungsschema kernmethylierter 1.8-dihydroxylierter Anthrachinone (Schema in Anlehnung an [23])

3.1.4. Identifizierung von Alp I als Chrysophanol

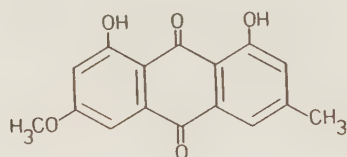
Das abgebildete Massenspektrum (Abb. 3) zeigt den Molmassenpeak bei m/e 254 sowie die typischen Fragmentationen aus CO -Abspaltungen bei m/e 226, m/e 198 und von m/e 180 zu m/e 152. Zusammen mit dem IR-Überlagerungsspektrum (Abb. 4) und Co-Chromatographie mit authentischer Vergleichsprobe ⁺⁾ liess sich Alp I eindeutig als Chrysophanol identifizieren.



⁺⁾ Für die Überlassung der Vergleichsproben Chrysophanol, Physcion, Emodin und Alaternin danke ich Herrn Dr. Just.

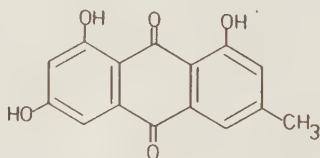
3.1.5. Identifizierung von Alp II als Physcion

Aus dem abgebildeten Massenspektrum (Abb. 3) ergibt sich der Molmassenpeak des Physcions mit m/e 284. Typische Fragmentierungen durch CO-Abspaltungen führen zu den Ionen m/e 256, m/e 228 und von m/e 226 zu m/e 198. Ein IR-Überlagerungsspektrum (Abb.4) sowie Co-Chromatographie mit authentischer Vergleichsprobe ergeben das Vorliegen von Physcion.

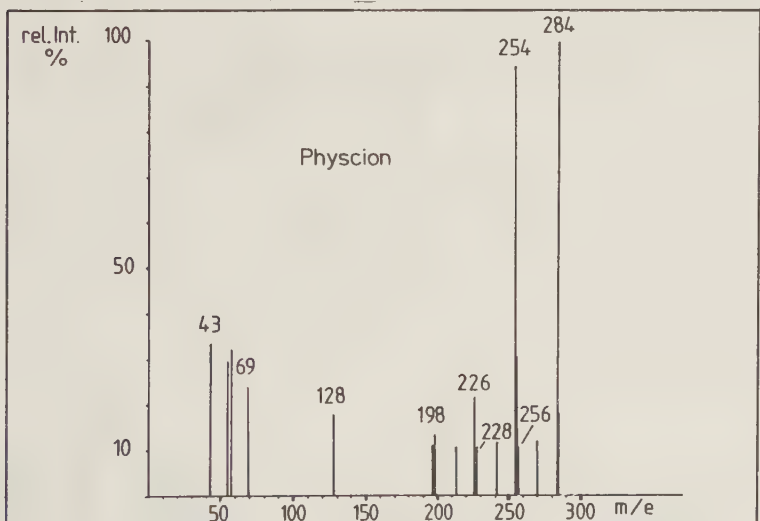
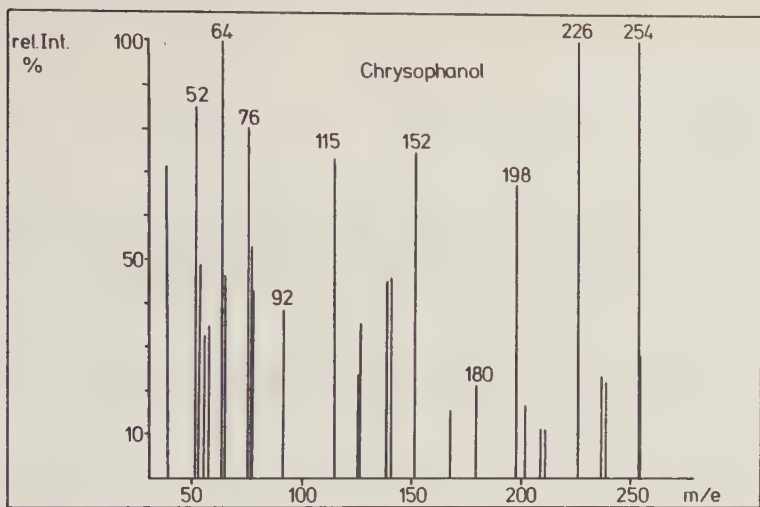


3.1.6. Identifizierung von Alp III als Emodin

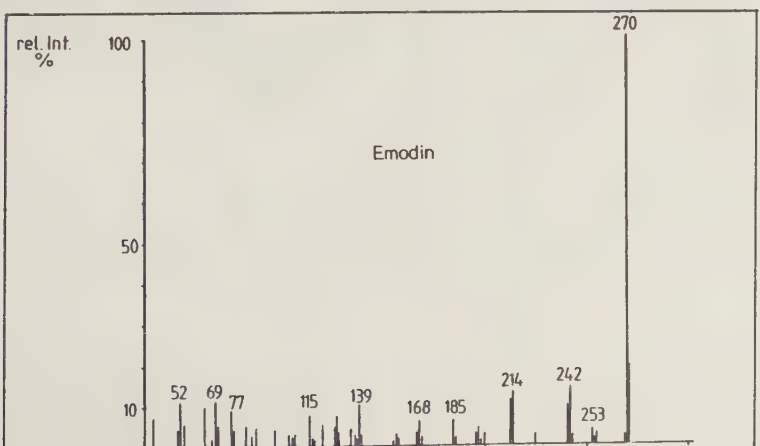
Aus dem abgebildeten Massenspektrum (Abb.3) mit dem Molmassenpeak bei m/e 270 und den typischen CO-Abspaltungen zu den Fragmentionen m/e 242 und m/e 214 sowie aus einem IR-Überlagerungsspektrum (Abb. 4) und Co-Chromatographie mit authentischer Vergleichsprobe ergibt sich eindeutig das Vorliegen von Emodin.



Weitere Daten zu Chrysophanol, Physcion und Emodin sind dem experimentellen Teil und [5,8] zu entnehmen.



b.3: MS von
IpI-AlpIII



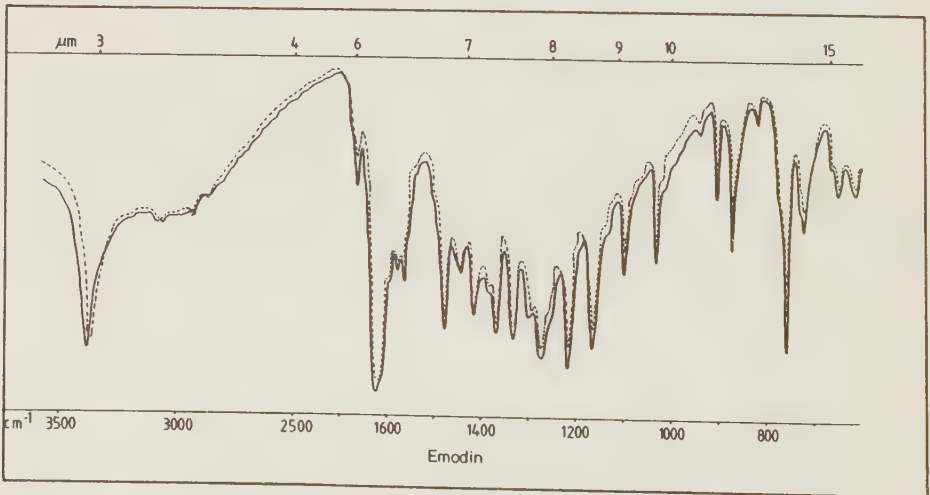
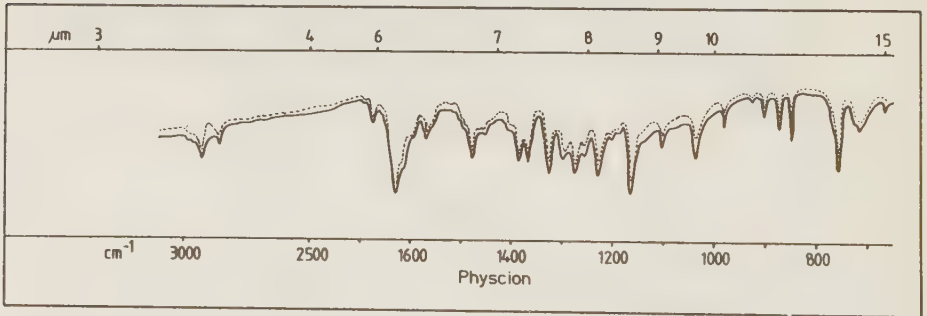
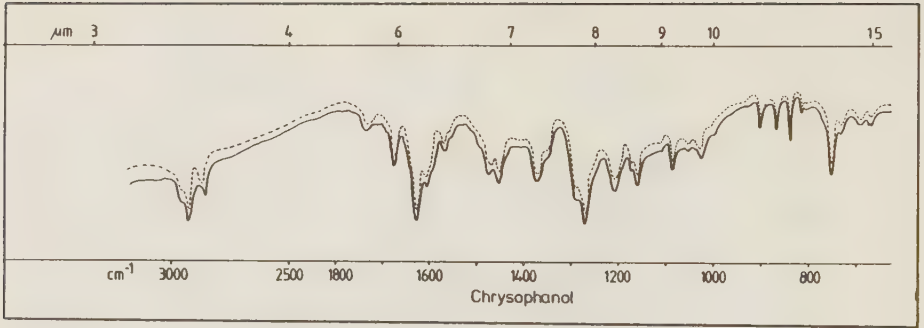
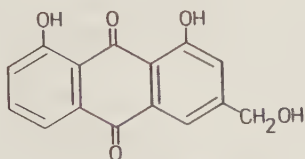


Abb.4: IR-Überlagerungsspektren

Somit konnten als Hauptanthrachinonaglyka die bereits bekannten Chrysophanol, Physcion und Emodin isoliert und identifiziert werden, wobei Emodin mengenmäßig deutlich überwiegt. Das Vorkommen von Aloe-Emodin wird von Weisgerber¹⁸ aufgrund eines einfachen dünnsschichtchromatographischen Nachweises angegeben. Nach starker Anreicherung eines Etherextrakts konnte zwar auf der Laufhöhe der Aloe-Emodin-Vergleichsprobe ein entsprechender Fleck geortet werden, eine eindeutige Klärung der widersprüchlichen Literaturbefunde ergibt erst die in Kap. 3.1.9. beschriebene HPLC-Analyse.



Aloe-Emodin

3.1.7. Identifizierung von Alp IV als Alaternin

Das 70 eV EI-MS (Abb. 5) zeigt das Molekülion bei m/e 286. Die für hydroxylierte Anthrachinone typische CO-Abspaltung erfolgt drei Mal zu den Ionen m/e 258, 230 und 202. Darüberhinaus weist die Abspaltung von CH_3 (-15) zum Fragmention m/e 271 auf ein kernmethyliertes Anthrachinonderivat²⁴.

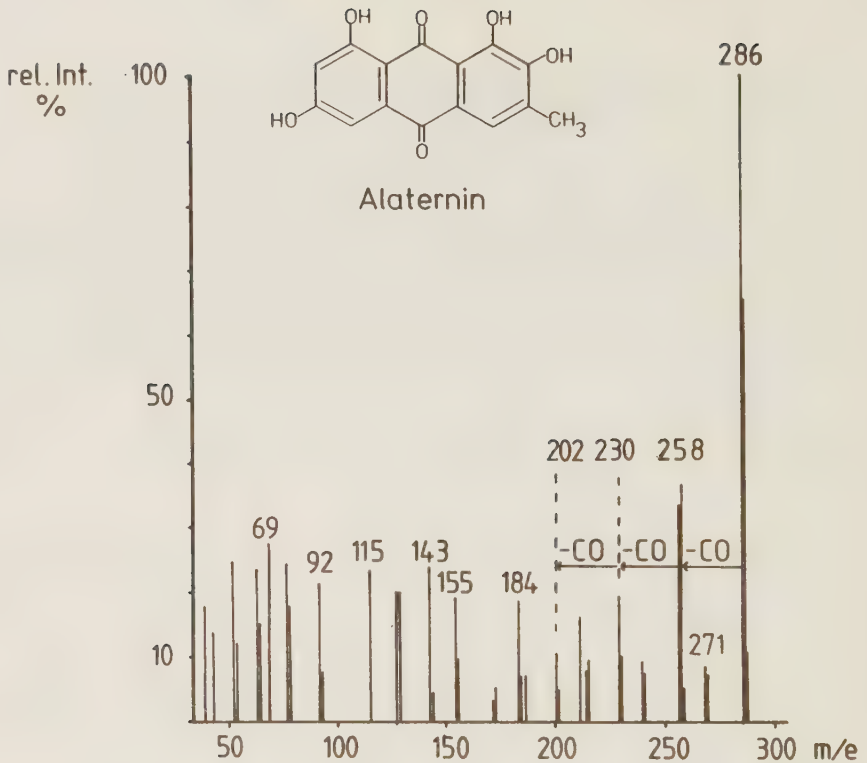


Abb. 5 : EI-MS von Alp IV

Das ^1H -NMR-Spektrum (Abb.6) zeigt vier Singulettis bei δ_{ppm} 7.53 (1H, H-4), 8.80 (1H, C-6-OH), 9.91 (1H, C-2-OH) und bei 12.10 (2H, C-1- und C-8-OH). Die aufgrund der Wasserstoffbrückenbildungsmöglichkeit tieffeldverschobenen Signale für C-1-OH und C-8-OH fallen aufeinander. Dieses isochrone Erscheinen beider Signale wird bei unsymmetrisch substituierten 1.8-Dihydroxyanthrachinonen bei Aufnahme der Spektren in

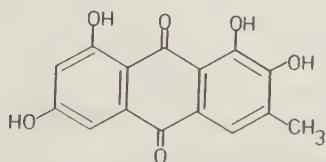
in DMSO- d_6 häufig beobachtet (vgl. dagegen [5], Aceton- d_6 : 12.17 und 12.27 ppm). Zwei Dubletts mit der für metaständig angeordnete, aromatische Protonen charakteristischen Kopplungskonstanten von $J = 2.3$ Hz erscheinen bei 6.60 ppm (1H, H-7, $J=2.3$ Hz) und bei 7.15 (1H, H-5, $J=2.3$ Hz). Darüberhinaus erscheint ein Singulett für eine aromatische Methylgruppe bei 2.31 ppm (3H, $-CH_3$). Der Austausch mit D_2O (Abb.7) läßt die Signale für die phenolischen Hydroxylprotonen bei δ ppm 8.80, 9.91 und 12.10 verschwinden.

Diese spektroskopischen Daten lassen sich nur mit denen des erstmals von Rauwald und Just ⁸ aus der Kreuzdornrinde in freier Form isolierten Alaternins vereinbaren.

Co-Chromatographie mit authentischer Vergleichsprobe sowie keine Depression des Mischschmelzpunkts bestätigen das Vorliegen von Alaternin (= 2-Hydroxy-emodin).

Alaternin wurde damit erstmals in der Rinde von *Rhamnus alpinus* ssp. *fallax* gefunden und insgesamt zum zweiten Mal in freier Form. Nach Publikation dieses Befundes wurde über ein weiteres Vorkommen in der Rinde von *Rhamnus alaternus* berichtet.

Interessanterweise enthalten somit die im Arzneibuch als Verfälschungen geltenden Kreuzdorn- und Fallaxrinde Alaternin, während es in den beiden officinellen *Rhamnus*-Rinden fehlt. Dies ist von analytischem Interesse, da Alaternin im Gegensatz zu den anderen Anthrachinonen im Verlauf der Bornträgerreaktion (Reaktion mit Lauge) nicht rot, sondern aufgrund der 1,2-Dihydroxypartialstruktur tief violett wird und somit leicht nachweisbar ist. Während Alaternin in Extrakten der Kreuzdornrinde (MeOH, $(C_2H_5)_2O$) eine auffällige dc-Zone zeigt, bedarf es zur dc-Identifizierung in Extrakten der Fallaxrinde einer vorherigen Anreicherung.



Alaternin

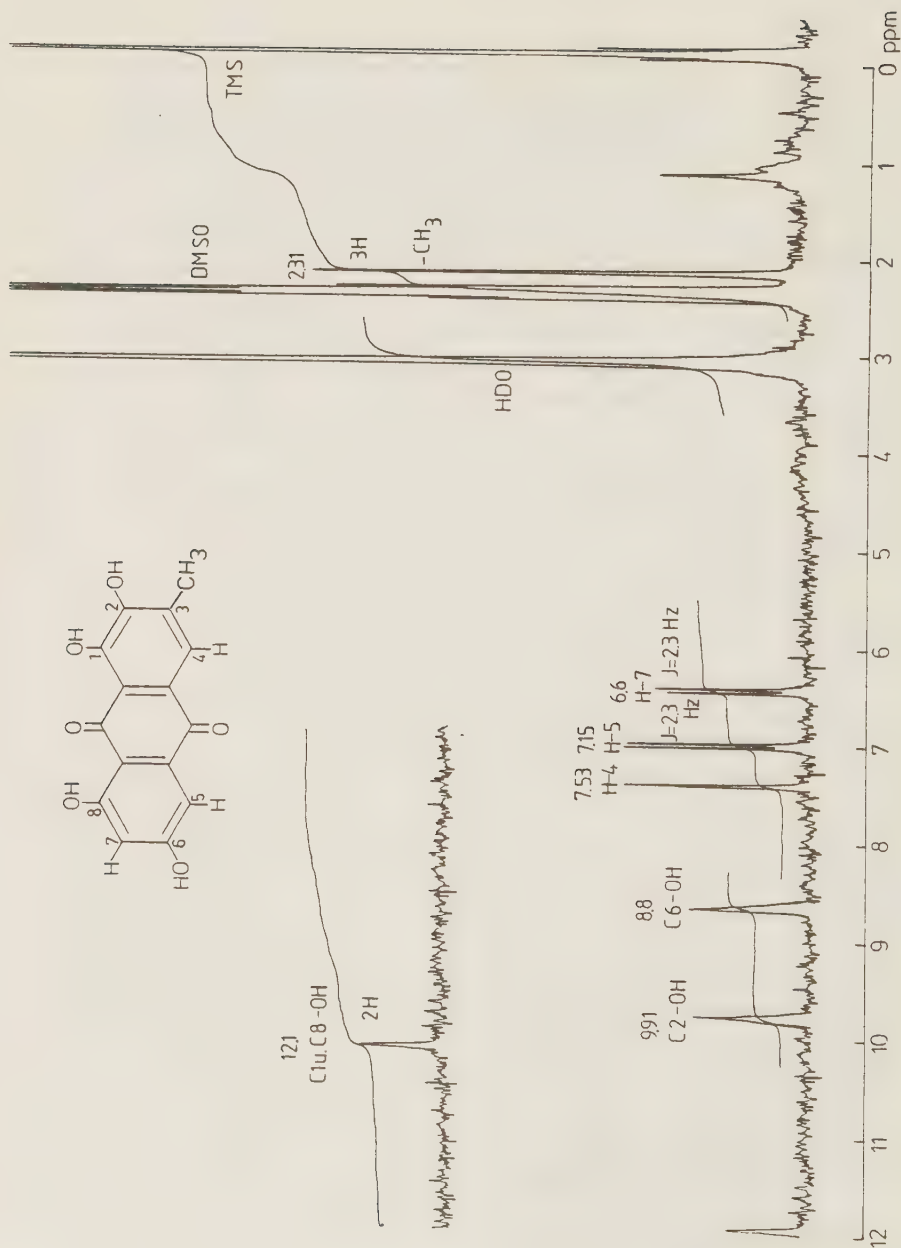


Abb. 6: ¹H-NMR (60 MHz/DMSO-d₆/ppm/TMS): Alp IV

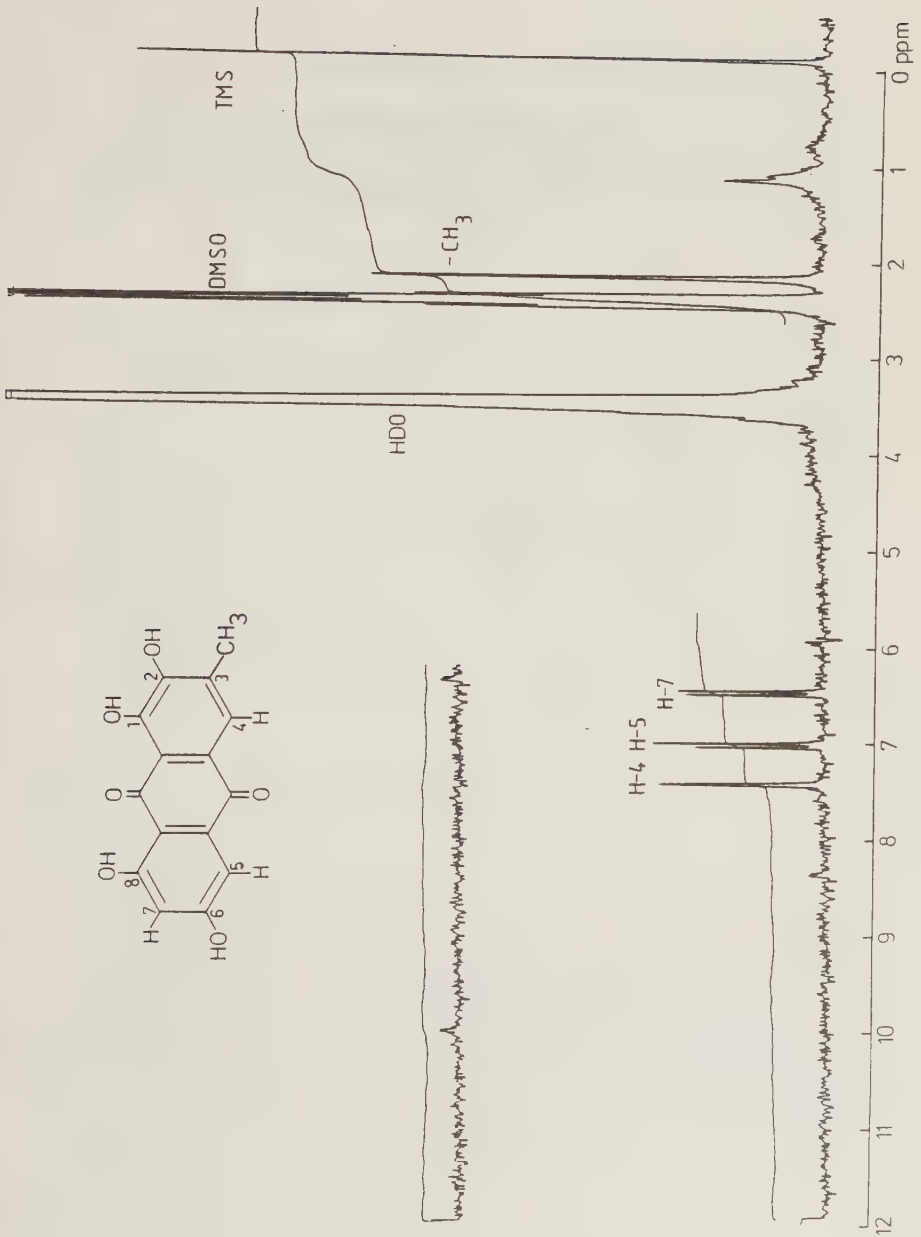


Abb.7: ^1H -NMR (60 MHz/ $\text{DMSO}-d_6 + \text{D}_2\text{O}$ /ppm/TMS) : Alp IV

3.1.8. Charakterisierung und Identifizierung von Alp V

Aus Fraktion 4 konnte durch Mehrfach-SC an Kieselgel 60 mit Toluol eine gelbrote, in dünnen Plättchen aus Methanol auskristallisierende Substanz, Alp V, rein dargestellt werden.

3.1.8.1. DC-Eigenschaften von Alp V

Im Fließmittel 1 nach Labadie ²⁶ (Toluol:Ethylformiat:Ameisensäure 75:24:1) ergibt sich für Alp V ein R_f-Wert von 0.43 (identisch mit Emodin).

	Tageslicht	UV 254 nm	UV 366 nm
Färbung von Alp V	gelb	Löschung	rote Fluoreszenz
nach Besprühen mit Kalilauge	rot	Löschung	hellrote Fluoreszenz

3.1.8.2. Spektroskopische Daten von Alp V

3.1.8.2.1. Massenspektroskopie

Alp V liefert im EI-MS (Abb.8) den Molmassenpeak bei m/e 260, woraus in Verbindung mit einer Hochauflösung die Summenformel C₁₄H₁₂O₅ resultiert (m/e gef. 260.0678; m/e ber. 260.0684). Wesentliche Fragmentationen finden sich bei m/e 245 [M-CH₃]⁺, m/e 231 [M-CHO]⁺ und m/e 217 [M-COCH₃]⁺.

Weitere Hinweise auf die Struktur von Alp V sollten die UV- und IR-Spektroskopie geben.

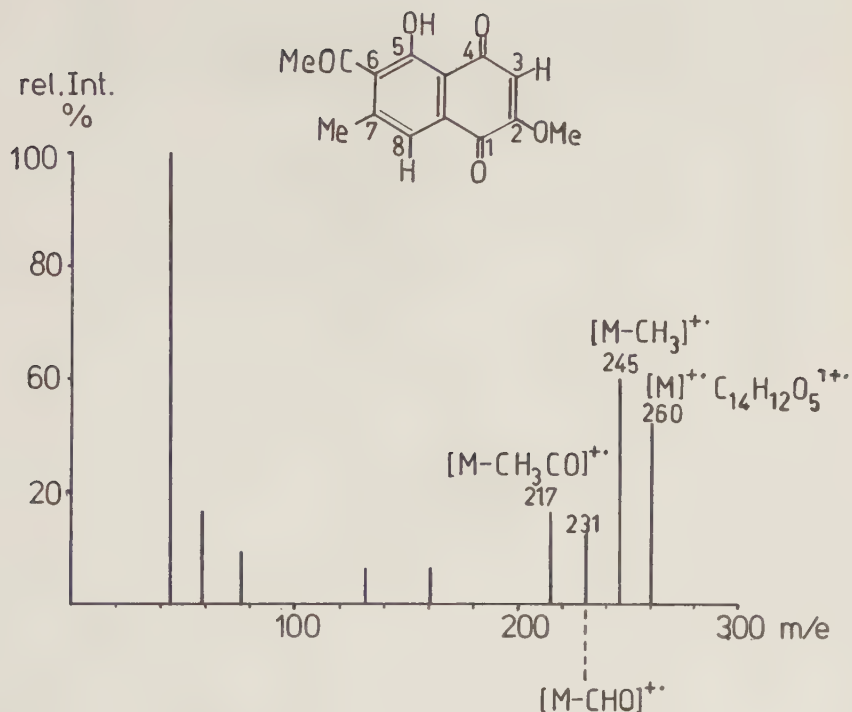


Abb.8 : Massenspektrum von Alp V

3.1.8.2.2. UV/VIS-Spektroskopie

Im UV/VIS-Spektrum (Abb.9) war zum einen das breite Maximum bei 414 nm von Interesse, wie es sich auch bei 1.8-Dihydroxyanthrachinonen findet. Andererseits zeigte das Vorhandensein von nur drei Maxima, daß es sich bei Alp V vermutlich nicht um ein 1.8-Dihydroxyanthrachinon handelt. Nach Harborne²⁶ haben diese üblicherweise 5 Absorptionsmaxima (z.B. Emodin in EtOH (nm) : 223, 254, 267, 290, 440).

Eine Ausnahme ist hier nur das Rhein mit 3 Maxima (vgl. auch Abb. 25). Hingegen haben Naphthochinone 3-4 Maxima (z.B. Juglon in EtOH (nm) : 249, 345, 422).

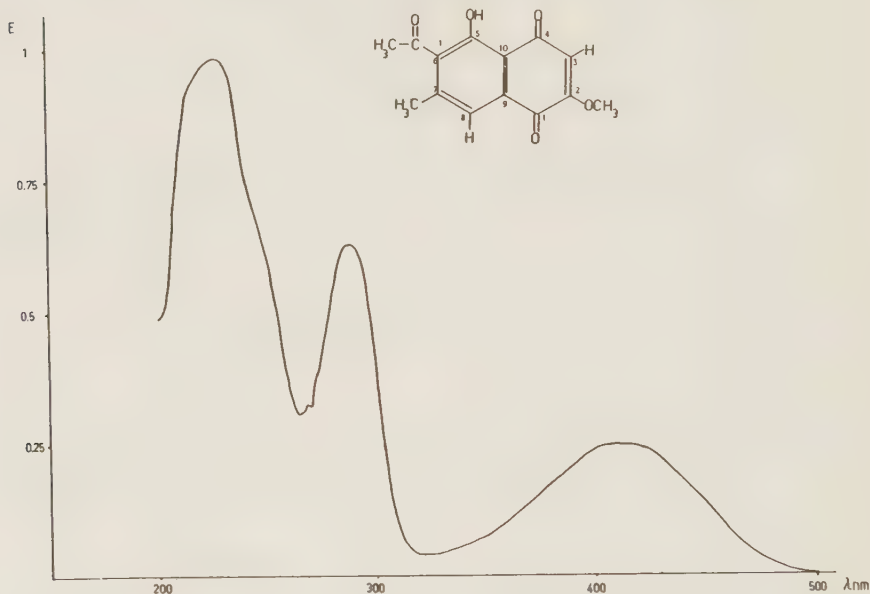


Abb.9 : UV/VIS-Spektrum von Alp V

3.1.8.2.3. IR-Spektroskopie

Das IR-Spektrum (Abb.10) ähnelt in wesentlichen Teilen den Spektren anderer Anthrachinone vom Emodintyp : Bei 2930 cm^{-1} findet sich die Bande für chelatisierte Hydroxylgruppen, bei 1680 cm^{-1} und 1630 cm^{-1} befinden sich die aufgrund der Chelatisierung deutlich unterschiedlich ausgeprägten Banden zweier chinoider Carbonylfunktionen und bei 1593 cm^{-1} erscheint die Bande für die C=C-Streckschwingung. Eine weitere

Carbonylbande findet sich bei 1705 cm^{-1} .

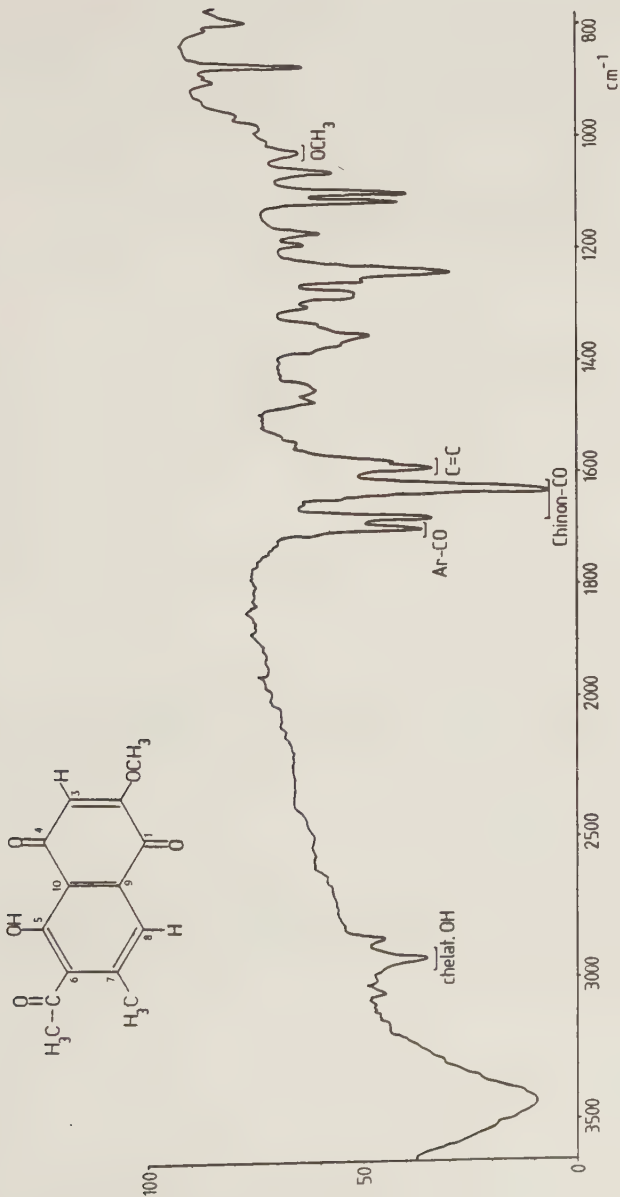
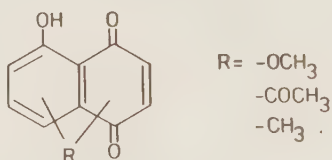


Abb.10 : IR-Spektrum von Alp V

Aus der Kombination der MS-, UV/VIS- und IR-Daten ließ sich zunächst die Struktur eines 1.8-Dihydroxyanthrachinons ausschließen, da sowohl die aus der Hochauflösung abgeleitete Summenformel als auch das Vorhandensein von lediglich drei UV/VIS-Absorptionsmaxima dagegen sprachen. Es mußte sich vielmehr bei Alp V um ein 5-Hydroxy -1.4-naphthochinon-derivat (= Juglonderivat) handeln :



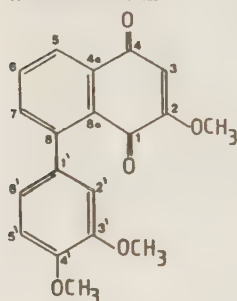
3.1.8.2.4. NMR-Spektroskopie

Alp V zeigt im ^1H -NMR-Spektrum (250 MHz/ CDCl_3 /ppm/TMS) (Abb.11) sechs Singulettts dreier Methylgruppen bei 2.38 ppm (Ar-Me), 2.62 ppm (Ar-COMe) und 3.96 ppm (Ar-OMe) sowie je eines Protons bei 6.16 ppm (Chinon-H), 7.52 ppm (Ar-H) und 12.52 ppm (chel. OH).

Aus den ^1H - und ^{13}C -chemischen Verschiebungen ergibt sich eine Methoxysubstitution des Chinonrings. Dies wird durch einen Datenvergleich mit Cassumunachinon (= 2-Methoxy-8-(3.4-dimethoxy-phenyl)-1.4-naphthochinon) bestätigt ²⁷ (siehe Abb.12).



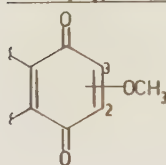
Abb.11 : ^1H -NMR-Spektrum (250 MHz/ CDCl_3 /ppm/TMS) von Alp V

Cassumunachinon δ /ppm

H-3: 6,15

C-2: 161,2

C-3: 108,4

Methoxystypandron δ /ppm

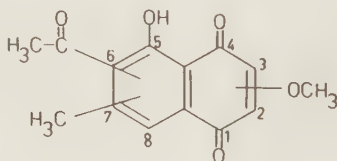
H-2/3: 6,16

C-2/3: 110,4 u 162,1

Abb.12 : ^1H - u. ^{13}C -Datenvergleich Cassumunachinon - Alp V

Die genaue Position des $-\text{OCH}_3$ -Substituenten im Chinonring war mit Hilfe der bisherigen Daten noch nicht bestimmbar. Die spektroskopisch einzige Möglichkeit, die Aufnahme eines protonengekoppelten ^{13}C -NMR-Spektrums (siehe [68]) war aus Substanzmangel nicht möglich.

Für die Positionen der aromatischen Acetyl- und Methylgruppe sind theoretisch sechs Konstitutionsisomere denkbar. Unter Zugrundelegung biogenetischer Erwägungen war insbesondere ein 6-Acetyl-7-methyl-Derivat in Betracht zu ziehen:



Dieses Substitutionsmuster findet sich im Stypandron (= 6-Acetyl-7-methyljuglon) ²⁸ aus Stypandra- und Dianella-Arten (Liliaceae) und in dessen 3-Methoxysubstitutionsprodukt Orientalon ²⁹ aus der Polygonaceae Rumex orientalis. Die ¹H-chemische Verschiebung des aromatischen Protons $\delta = 7.52$ ppm stimmt gut mit den für diese Pflanzenstoffe angegebenen Werten von 7.46 bzw. 7.65 ppm überein. Die durch additive Substitutionsinkremente ³⁰ abgeschätzte ¹H-Resonanz mit $\delta = 7.59$ ppm (bezogen auf die Protonen des Juglons ³¹, dessen 6- ³² und 7- ³³ Methylderivate und des 8-Dichloracetyl-7-methyljuglons ³⁴) steht in guter Übereinstimmung mit dem gefundenen Wert von 7.52 ppm für das Substitutionsmuster des Stypandrins. Für die übrigen fünf möglichen Isomere ergibt sich : H ber. für 3 Isomere: $\delta > 8$ ppm
H ber. für 2 Isomere: 7.17 u. 7.72 ppm.

Zur Ermittlung der genauen Positionen der aromatischen Substituenten wurde ein ¹H-breitbandentkoppeltes ¹³C-NMR-Spektrum aufgenommen (Abb.13). Die mit Hilfe additiver Verschiebungsinkremente auf die aromatischen C-Atome ³⁵ des Juglons als der strukturähnlichsten Verbindung mit eindeutig zugeordneten ¹³C-Signalen ³⁶ berechneten ¹³C-Verschiebungen der sechs möglichen Strukturisomeren wurden den für Alp V ermittelten δ_C -Werten gegenübergestellt. Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, lassen sich so die Werte für die aromatischen Ringkohlenstoffe 5 - 10 der vermuteten Struktur in sehr guter Näherung aus Juglon berechnen. Der Vergleich mit dem Kriterium der größten Übereinstimmung führt zu der Zuordnung einer 6-Acetyl-7-methyl-Substitution in Alp V.

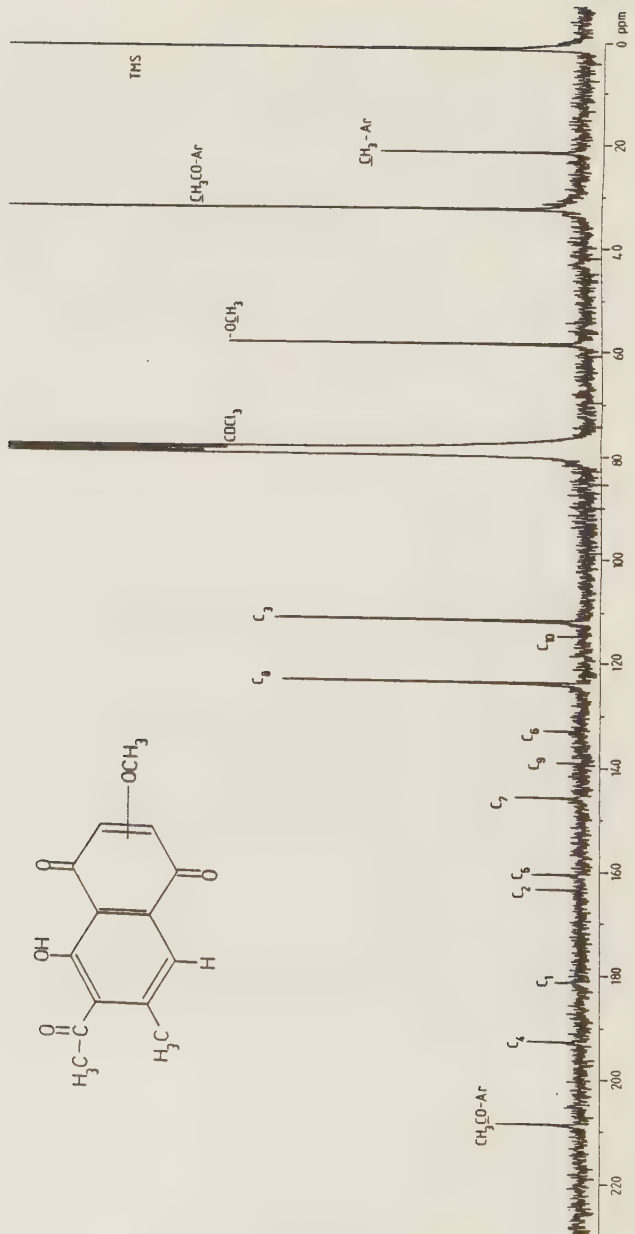


Abb.13 : Breitbandentkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum von Alp V

Tabelle 1: Zuordnung der ^{13}C -NMR-Signale von Alp V

C-Atom	Alp V (a)	Berechnete (C5-10) und Literaturwerte (b) (C1-4)
1	181.7	183.9
2	162.2	161.2
3	110.4 (c)	108.4
4	191.4	190.0
5	159.2	161.4
6	131.5	134.1
7	144.4	145.9
8	122.5 (c)	119.7
9	138.8 (d)	135.7
10	114.8 (d)	115.0
CH_3CO	31.3 (c) und 207.4	
$-\text{CH}_3$	20.4 (c)	
$-\text{OCH}_3$	57.3 (c)	57.0 (b)

(a) Werte bezogen auf $\text{CDCl}_3/\text{TMS/ppm}$

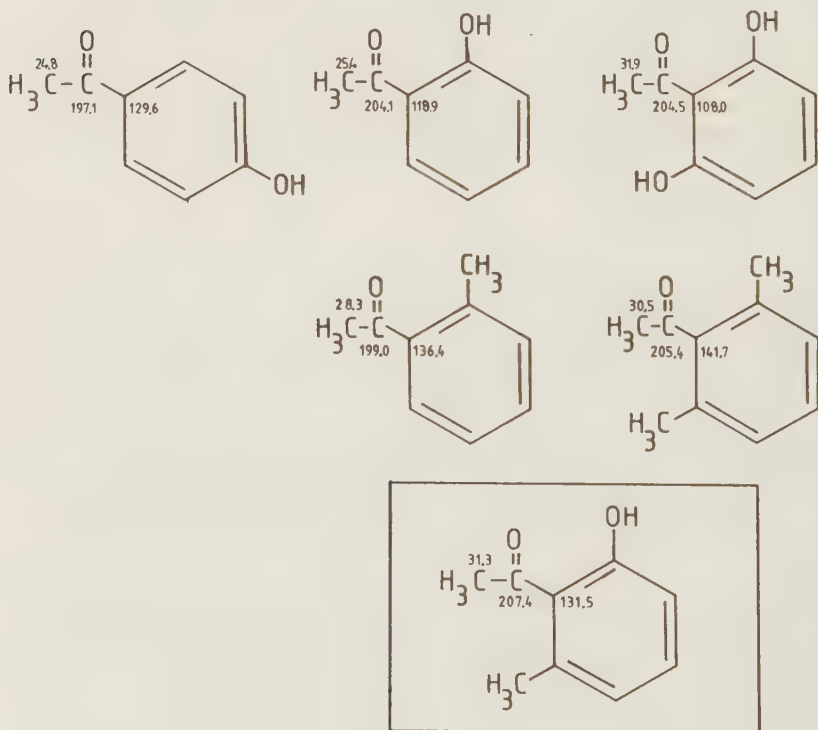
(b) C1,4 bez. auf Juglon, C2,3 bez. auf Cassumunachinon

(c) rel. hohe Signalintensitäten aus C-H_x -Gruppierungen

(d) Brückenkopf-C-Atome: sehr intensitätsschwache Signale

Neben dieser Auswertung des ^{13}C -NMR-Spektrums ergibt sich ein weiterer Befund für das Vorliegen einer o,o'-disubstituierten Acetylgruppe aus den ^{13}C -Verschiebungen der Methyl- und Carbonylkohlenstoffe dieser Acetylgruppe, wenn der Betrachtung des aromatischen Rings eine Acetophenongrundstruktur zugrundegelegt wird. Nach Breitmaier und Bauer ³⁵ unterliegt der Carbonylkohlenstoff sowohl Konjugationseffekten (sterische Abstoßung o-substituierter Phenylketone) wie auch dem Einfluß intramolekularer Wechselwirkungen (z.B. H-Brücke im

2-Hydroxyacetophenon). Diese Effekte äußern sich bei o,o'-Methyl- bzw. Hydroxylsubstituenten in einer deutlich zunehmenden Entschirmung der Carbonyl- und Methylkohlenstoffatome, wie dies einer von Breitmaier und Völter³⁷ erstellten Tabelle der ^{13}C -Verschiebungen substituierter Acetophenone zu entnehmen ist (Tabelle 2, Abb. 14).



CH_3CO	<	30 ppm	} nur bei o,o'-Disubstitution mit OH und CH_3
CH_3C	<	204 ppm	
C-ipso	=	131.5 ppm	

Abb.14 : Vergleich von $\delta_{\text{C}13}$ verschieden substituierter Acetophenone mit den für Alp V gefundenen Werten (im Kasten)

Tabelle 2: ^{13}C -Verschiebungen verschiedener Acetophenone (ACP)
und Alp V

	Carbonyl-C	$\text{CH}_3\text{-CO}$	C-ipso
2-OH-ACP	204.1	25.4	118.9
4-OH-ACP	197.1	24.8	129.6
2- CH_3 -ACP	199.0	28.3	136.4
2.6-di-OH-ACP	204.5	31.9	108.0
2.6-di- CH_3 -ACP	205.4	30.5	141.7
Alp V	207.4	31.3	131.5

Abb.15 zeigt die Zuordnung der ^{13}C -NMR Signale in Alp V:

ZUORDNUNG DER ^{13}C -NMR SIGNALE (δ /PPM)

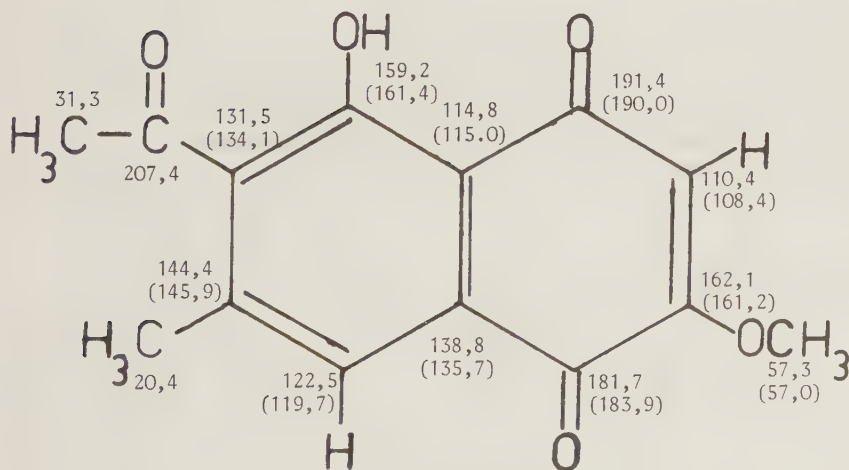


Abb.15: (BERECHNETE UND LITERATURWERTE)

C-1,4 BEZ. AUF JUGLON; C-2,3 BEZ. AUF CASSUMINACHINON

Wie bereits dargelegt, ließ sich die genaue Position der Methoxygruppe im Chinonring mit den zur Verfügung stehenden kernresonanzspektroskopischen Daten nicht ermitteln. Alternativ gelang dies anhand eines UV/VIS-Spektren-Vergleichs mit 2-Hydroxy- bzw. 3-Hydroxyjuglonen. Nach den intensiven Untersuchungen des Arbeitskreises Moore und Scheuer ³⁸ und den Angaben einer neueren Übersichtsarbeit ³⁹ gelingt eine eindeutige Unterscheidung zwischen einem 2- oder 3-Hydroxyjuglon durch den "Alkali-Shift" der Chinoidbande bei ca. 400 nm ($n \rightarrow \pi^*$) im UV/VIS-Spektrum. Dies führt bei 2-Hydroxyjuglon aufgrund der Chelatisierungsmöglichkeit am C-1-Carbonyl zu einer deutlich größeren bathochromen Verschiebung gegenüber dem 3-Hydroxyderivat (ca. 35-55 nm) und zu einem zusätzlichen hypsochromen Effekt mit einer Absorption bei 380 nm. Zur Messung dieser Effekte war ein chemischer Abbau von Alp V notwendig.

3.1.8.2.5. Chemischer Abbau von Alp V

Eine Etherspaltung, d.h. die Überführung von Alp V in das entsprechende Hydroxyderivat, erfolgt aufgrund der vinylogenen Carbonsäureesterstruktur bereits mit warmem Alkali (Pottasche) (Abb.16):

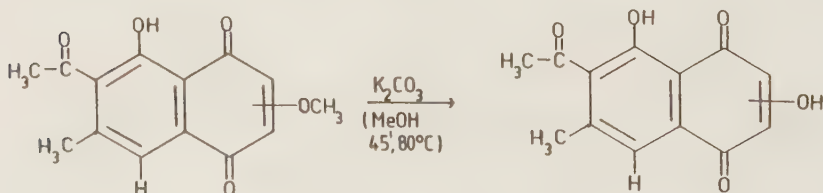


Abb.16: Etherspaltung von Alp V

Das aus dem Ansatz nach Ansäuern mit HCl mit Diethylether ausgeschüttelte Reaktionsprodukt zeigte, wie die $^1\text{H-NMR}$ -Überprüfung (Abb. 17 u. 18) ergab, eine vollständige Entmethylierung.

3.1.8.2.6. Festlegung der Position der Methoxygruppe durch UV/VIS-Datenvergleich

Die Tabelle 3 und Abb.19 zeigen die erhaltenen UV/VIS-Absorptionen.

Tab.3: UV/VIS-Absorptionen von Alp Va (entmethyliertes Alp V) u. Hydroxyjuglonen (λ_{max} , nm, 0.05 n methanol. KOH)

	MeOH	MeOH/ OH^-
2-Hydroxyjuglon	409	380 u. 470 ³⁸ bzw. 490 ³⁹
3-Hydroxyjuglon	410	435 ^{38,39}
Alp Va	410	380 u. 480

Aus der vollständigen Übereinstimmung der UV/VIS-Absorptionen von Alp Va und 2-Hydroxyjuglon läßt sich die Struktur von Alp V eindeutig als 2-Methoxy-5-hydroxy-6-acetyl-7-methylnaphthalen-1.4-dion festlegen.

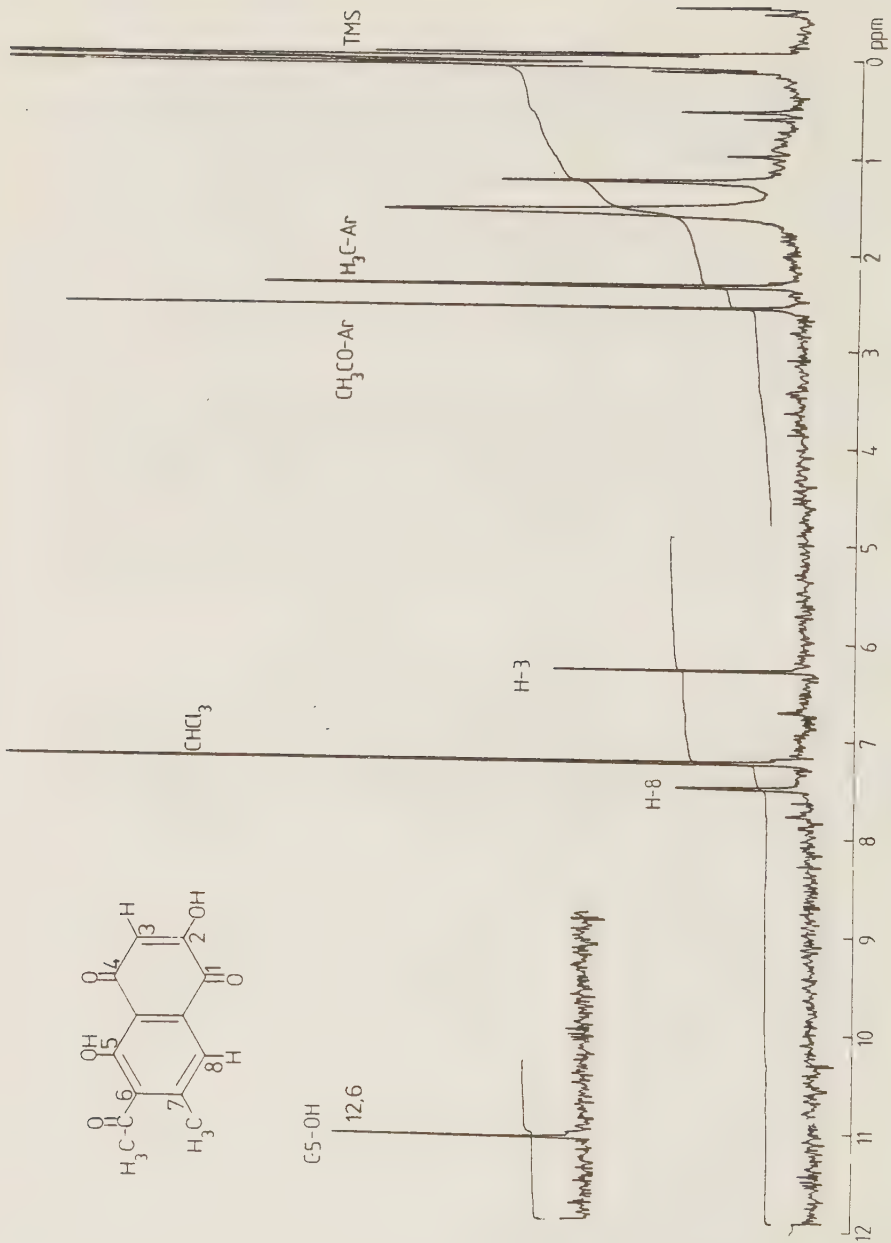


Abb.17: ^1H -NMR (60 MHz/ CDCl_3 /TMS/ppm) von Alp Va

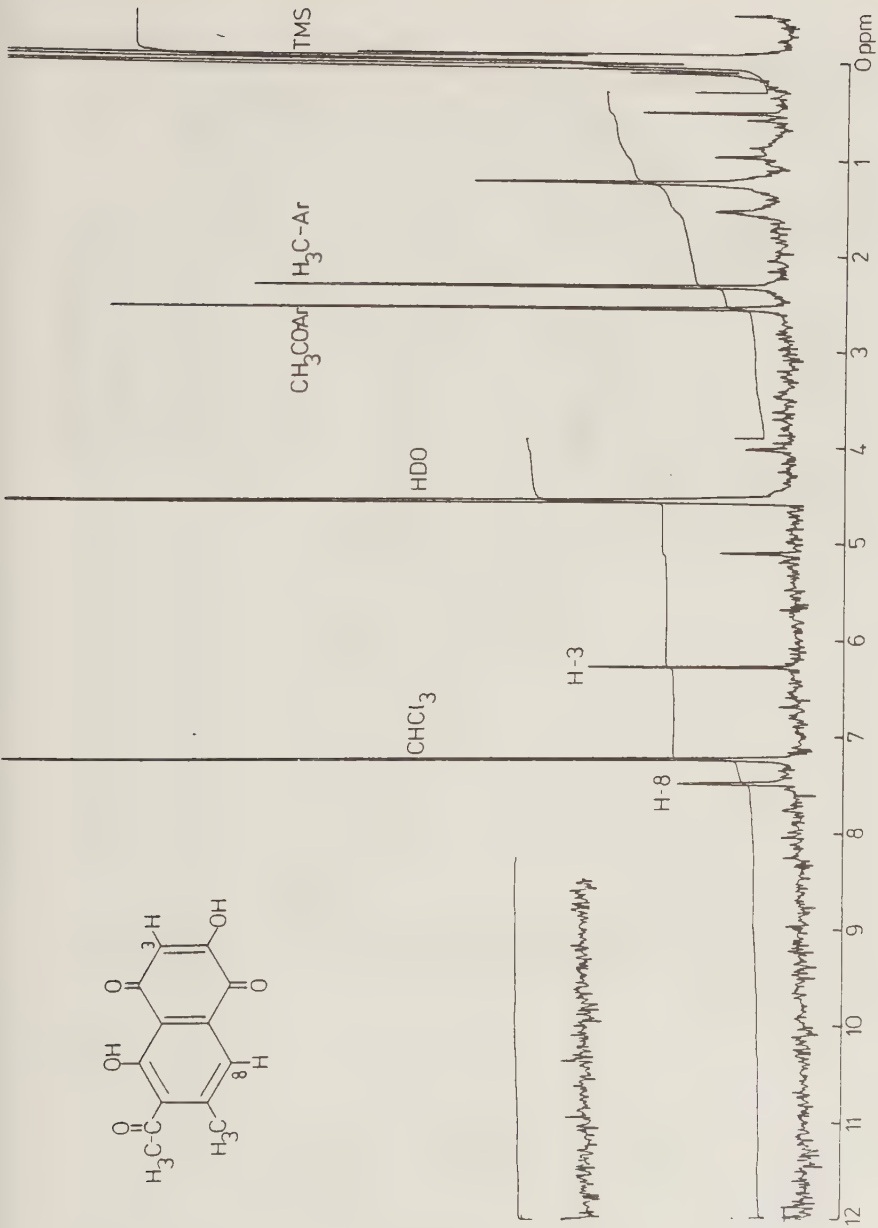


Abb.18: ¹H-NMR (60 MHz/CDCl₃+D₂O/TMS/ppm) von Alp Va

NACHWEIS DER STELLUNG DER METHOXYGRUPPE IM CHINONRING

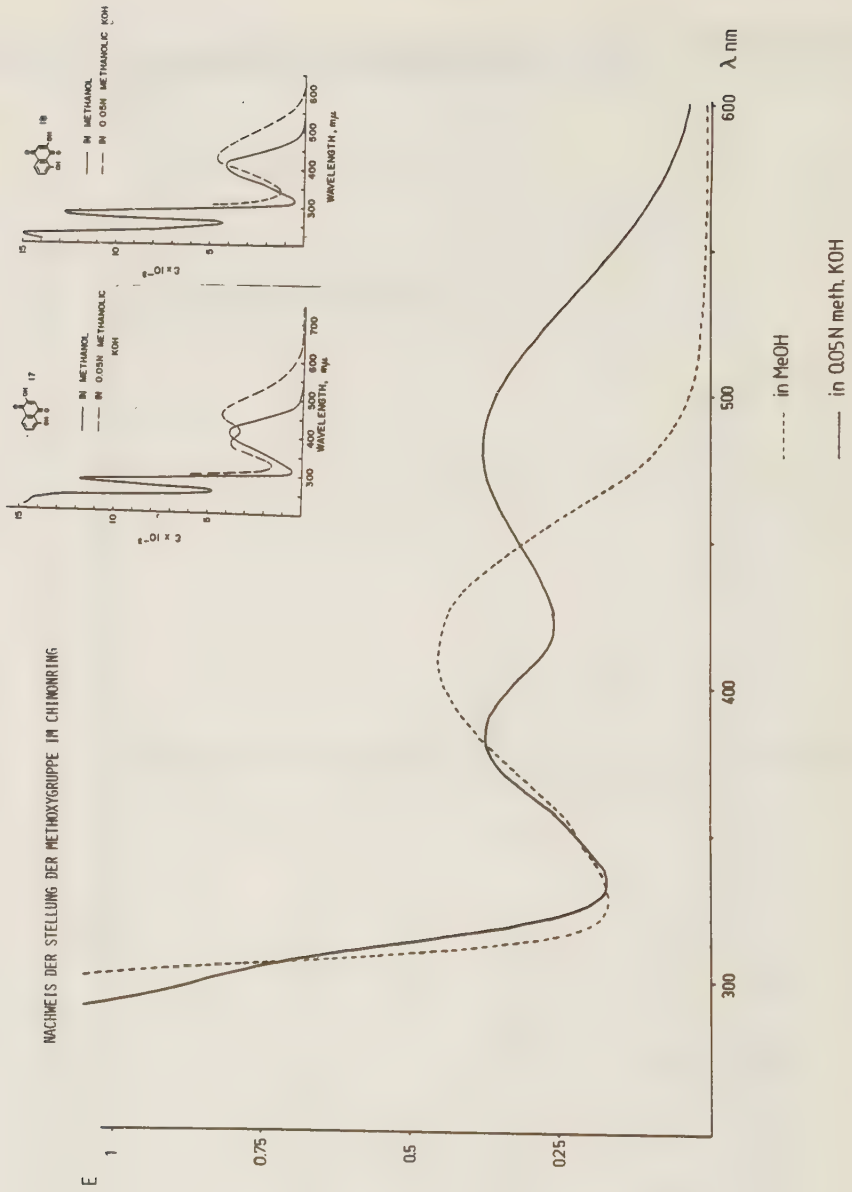


Abb.19

3.1.9. Qualitative HPLC-Untersuchung der isolierten Anthra- und Naphthochinone Alp I - Alp V

Prüfung auf das Vorkommen von Aloe-Emodin und Alp VIa (=Aglykon von Alp VI)

Nachdem das umstrittene Vorkommen von freiem Aloe-Emodin dünn-schichtchromatographisch nicht eindeutig geklärt werden konnte (vgl. 3.1.6.), sollte eine qualitative Analyse mittels der HPLC-Technik eine genaue Klärung ergeben.

Dazu wurden aus der gepulverten Droge von *Rhamnus fallax* drei Extrakte mit Ether, Essigester und Chloroform durch Erwärmen unter Rückfluß gewonnen. Die filtrierte Extrakte wurden mehrfach mit 1n NaOH ausgeschüttelt, die NaOH-Lösungen mit HCl angesäuert und mehrfach mit Essigester ausgeschüttelt. Die eingeeengten EtAc-Extrakte wurden in Methanol aufgenommen und dienten als Untersuchungslösungen.

Als Vergleichslösungen wurden die methanolischen Lösungen von Alp I - Alp V, Alp VIa sowie Aloe-Emodin verwendet.

Die Detektion erfolgte bei 430 nm.

Abb. 20 zeigt die dc Trennung der Vergleichssubstanzen.

Abb. 21 zeigt die HPLC-Trennung der 7 Vergleichssubstanzen.

Abb. 22 zeigt die Chromatogramme der drei Untersuchungslösungen. Aloe-Emodin (3) war unter den gewählten Bedingungen (s. exp. Teil) nicht nachweisbar. Ebenfalls wurde kein Peak für die Aglykonkomponente von Alp VI (vgl. nachfolgendes Kap.) beobachtet, die demnach nicht in freier Form in der Rindendroge vorkommt. Alp I - Alp V waren eindeutig zuzuordnen.

AlpIV : Alaternin
 " V : 2-Methoxystypandron
 " VIa : Aglykon von Alp VI
 " III : Emodin
 " II : Physcion
 " I : Chrysophanol

Fließmittel: Cyclohexan 35
 Methylchlorid 30
 Ethylformiat 30
 Ameisensäure 5



Abb.20: DC-Trennung von Alp I - V, Alp VIa u. Aloe-Emodin

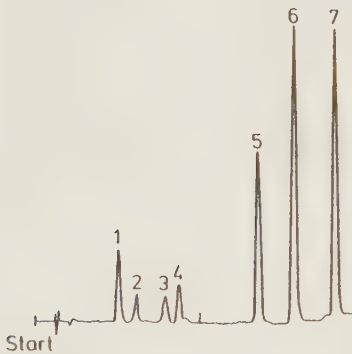


Abb.21: HPLC-Trennung der Vergleichssubstanzen

- 1: Alp V (2-Methoxystypandron)
- 2: AlpVIa (Aglykon von Alp VI)
- 3: Aloe-Emodin
- 4: Alp IV (Alaternin)
- 5: Alp III (Emodin)
- 6: Alp I (Chrysophanol)
- 7: Alp II (Physcion)

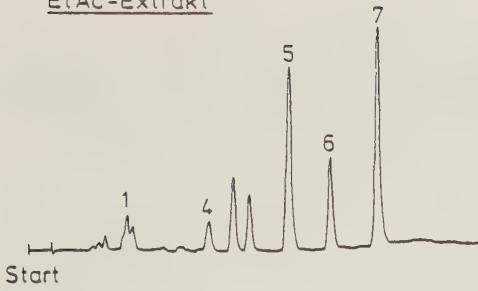
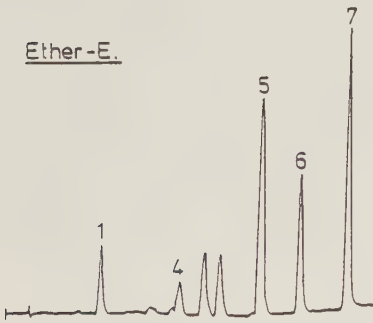
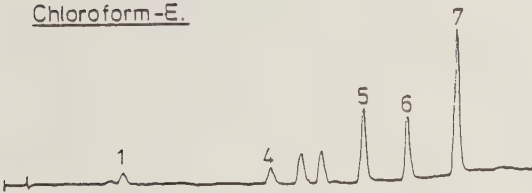
EtAc-ExtraktEther-E.Chloroform-E.

Abb.22: HPLC-Trennung der drei Extraktlösungen

3.2. Isolierung und Strukturaufklärung von Rhamnalpinosid (= Alp VI), dem Leitstoff der Fallaxrinde gemäß Ph.Eur. II

3.2.1. Alp VI als Leitstoff: Bemerkungen zur dc Prüfungs- vorschrift gemäß Ph. Eur. II

Das Europäische Arzneibuch prüft die Droge *Frangulae Cortex* (*Rhamnus frangula*, *Rhamnaceae*) auf Reinheit mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. Dabei darf nach Entwickeln des Chromatogramms und Besprühen mit KOH-Lösung R sowie 15minütigem Erwärmen bei 100-105°C bei Tageslicht keine rote Zone mit einem Rf-Wert von 0.10-0.15 erscheinen, welche auf fremde Beimengungen von Fallaxrinde hinweist. Bevor im folgenden die Isolierung und Strukturaufklärung dieser der roten Zone zugrundeliegenden Substanz beschrieben werden, seien einige kritische Bemerkungen über Alp VI als Leitstoff gemäß Ph. Eur. II erlaubt.

Diese Reinheitsprüfung des Arzneibuchs ist insofern problematisch, als die entsprechende rote Zone selbst bei ausschließlicher Verwendung von Fallaxrinde, also nicht als fremde Beimengung von Faulbaumrinde, und bei exakter Durchführung der Vorschrift nur sehr schwach und undeutlich nach dem Besprühen mit KOH-Lösung im UV-Licht bei 366 nm zu erkennen ist. Bei Tageslicht ist sie weder vor noch nach dem Besprühen sichtbar. Eine nur teilweise Verfälschung von *Frangulae Cortex* ist somit auf diese Weise kaum zu erkennen (Abb.23). Werden für die Auswahl eines Leitstoffes die Kriterien gestellt, daß er ein charakteristischer und spezifischer Inhaltsstoff ist und analytisch leicht bestimmbar sein muß, so trifft zwar die erste Forderung zu. Der sichere und einfache Nachweis ist bei der angegebenen Prüfungs-
vorschrift aber schwer möglich. Eine Reihenuntersuchung, durchgeführt von Studenten im phytochemischen Praktikum,

bestätigt dies. Die einfache und sichere Identifizierung von *Rhamnus fallax*, sowohl als Monodroge wie auch als mögliche, fremde Beimengung der Faulbaumrinde, gelingt in Anlehnung an das DAB 7⁵⁴ mit Hilfe des Xanthorhamnins (vgl. 2.3.). Xanthorhamnin zeigt bei der dünnschichtchromatographischen Reinheitsprüfung gemäß Ph. Eur. II vor dem Besprühen bei Betrachtung im langwelligen UV-Licht eine intensive, dunkelbraune bis schwarze Zone mit einem R_f -Wert von 0.25 (bei Tageslicht gelb). Nach dem Besprühen mit einer 5%igen $AlCl_3$ -Lösung fluoresziert Xanthorhamnin intensiv grün. Im DAB 7 wurde *Frangulae Cortex* auf das Vorhandensein dieses Flavonoglykosids im Reagenzglas mit Hilfe des für Flavonole charakteristischen Tauböck-Tests überprüft.

Fließmittel:	Essigester	100
	Methanol	17
	Wasser	13

- 1: Franguline A/B
- 2: Ethanol. Extrakt aus *Rhamnus alpinus*
- 3: Glukofranguline A/B
- 4: Alp VI
- x: Xanthorhamnin

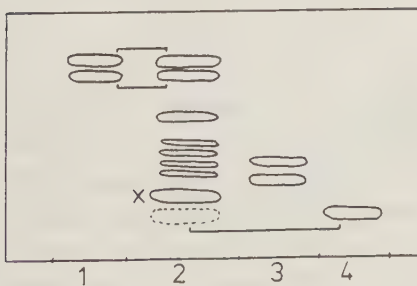


Abb.23: DC eines ethanol. Extrakts aus *Rhamnus alpinus* nach Ph. Eur. II

3.2.2. Isolierungsschema I für Alp VI

1600 g gepulverte Droge werden 3x mit je
3.5 l Wasser am Ultraturax extrahiert

das Filtrat wird mehrfach mit
Essigester ausgeschüttelt

Essigester-Extrakt (nach i.V. einengen ca. 2 g)

Vorfraktionierung am DCCC mit dem
Fließmittelsystem $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$
7:13:8 + 0.5% Ameisensäure. Oberphase
als mobile Phase, die Alp VI ent-
haltenden Fraktionen erscheinen bei
einem Durchfluß von ca. 20 ml/h
nach 25 Stunden

vereinigte Alp VI-Fractionen

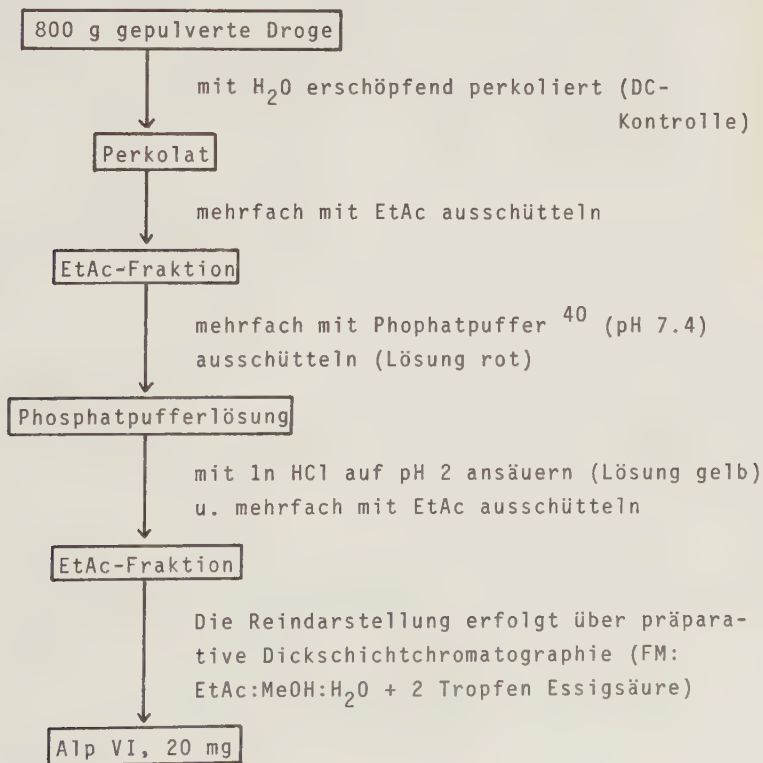
Erneute Fraktionierung am DCCC mit dem
gleichen Fließmittelsystem, aller-
dings ohne Ameisensäure. Alp VI er-
scheint nach ca. 5 Stunden

Alp VI, 4 mg

Der Zusatz von Säure zum Fließmittelsystem des DCCC läßt bei Verwendung der polaren Phase als mobiler die phenolischen Anthraglykoside wegen der Verschiebung des Gleichgewichts Phenol Phenolat zugunsten des lipophileren Phenols ca. 5 Stunden länger in der stationären Phase verweilen. Die hier auftretende Verzögerung von ca. 20 Stunden läßt somit auf eine

wesentlich saurere Verbindung schließen. Dies führt zusammen mit der Erkenntnis, daß Alp VI trotz seiner großen Polarität nur einen Zucker besitzt (s. 3.2.7.) zur Vermutung des Vorliegens einer glykosidischen Anthrachinoncarbonsäure. Danach ließ sich folgendes, vereinfachtes, auf der Carbonsäurestruktur basierendes Isolierungsschema erstellen und erfolgreich durchführen.

3.2.3. Optimierte Isolierungsverfahren (Schema II) für Alp VI



3.2.4. UV/VIS-Spektroskopie

Das UV/VIS-Spektrum von Alp VI zeigt zwei Maxima bei 221 nm und bei 283 nm sowie ein schwach ausgeprägtes Plateau von 350-450 nm, welches nach Alkalizusatz uncharakteristisch bathochrom verschoben wird (Abb.24). 1.8-Dihydroxyanthrachinon-Derivate zeigen dagegen bei ca. 430 nm (z.B. Rhein Abb.25) eine intensive Absorption und eine deutliche bathochrome Verschiebung dieses Maximums nach Alkalizusatz von ca. 80 nm⁶⁴. Das Fehlen dieses charakteristischen Maximums sowie das Vorhandensein von lediglich drei Absorptionen (vgl.3.1.8.2.2.) machen somit das Vorliegen eines 1.8-Dihydroxyanthrachinons unwahrscheinlich. Eine eingehende UV-Analyse unter Einbeziehung der Aglykonkomponente von Alp VI ist in 3.2.9.) beschrieben.

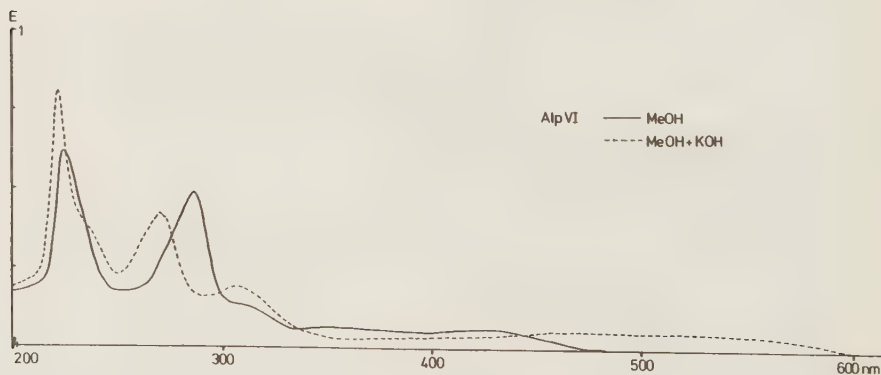


Abb.24: UV/VIS-Spektrum von Alp VI

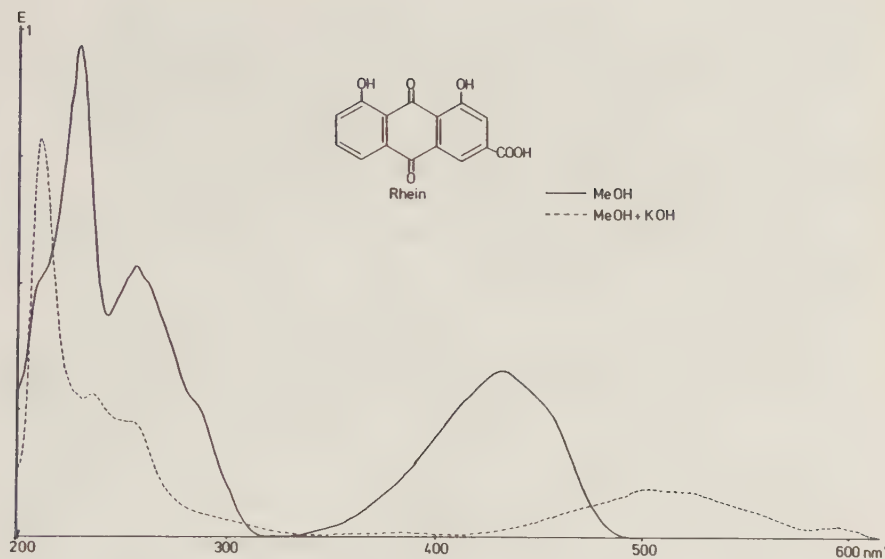


Abb.25: UV/VIS-Spektrum von Rhein

3.2.5. Massenspektroskopie

Im EI-MS (Abb.26) wurde aufgrund der Glykosidnatur erwartungsgemäß kein Molekülpeak für Alp VI erhalten. Das höchstregistrierte Ion bei m/e 328 entspricht dem Anthrachinon-aglykon und ergibt in Kombination mit einer Hochauflösung (ber. 328.0487264, gef. 328.0482187) die Summenformel $C_{17}H_{12}O_7$. Den ebenfalls hochaufgelösten Fragmentationen bei m/e 284 und m/e 270 entsprechen die Summenformeln $C_{16}H_{12}O_5$ und $C_{15}H_{10}O_5$. Der Übergang von m/e 328 nach m/e 284 (base peak) erfolgt durch die für aromatische Carbonsäuren typische Abspaltung von CO_2 (M-44). Der weitere Abbau ähnelt weitgehend dem

bei Physcion (vgl. 3.1.5.) beobachteten, d.h. Abspaltung einer Methoxylgruppe und mehrfache CO-Eliminierung sowie Verlust einer Methylengruppe (m/e 284 $\rightarrow$ m/e 270). Das Vorliegen einer Carbonsäurestruktur, aufgrund des Verhaltens bei den Isolierungsversuchen bereits vermutet, konnte somit massenspektroskopisch belegt werden. Die Ergebnisse der EI-MS der Trimethylsilyl- und Acetyl-Derivate bestätigen und ergänzen diese Befunde:

Die Fragmentierung zweier TMS-Reste aus dem Ion m/e 473/74 weist auf das Vorliegen von zwei aciden OH-Gruppen ($-COOH$, phenol. OH) hin. Die entsprechenden Bruchstücke finden sich bei m/e 400/1 und bei m/e 328. Die weitere Fragmentierung verläuft analog der des underivatisierten Alp VI. Hinsichtlich der Zuckerkomponente erscheint bei m/e 369 das Signal für die dreifach trimethylsilylierte Apiose. Die Abspaltung eines TMS-Restes führt zum Signal bei m/e 296.

Aus dem Spektrum der acetylierten Verbindung konnte ebenfalls das Molekülion nicht nachgewiesen werden. Die einmalige Keteneeliminierung aus dem Ion m/e 368 zu m/e 328 zeigt allerdings, daß eine phenolische Hydroxylgruppe acetyliert vorliegen sollte. Hinsichtlich der Zuckerkomponente erscheint darüberhinaus bei m/e 259 ein charakteristischer, intensiver Peak für die triacetylierte Apiose (entspr. $C_{11}H_{15}O_7$). Aus den dargelegten massenspektroskopischen Daten ergibt sich für das Aglykon, daß von den sieben Sauerstofffunktionen zwei derivatisierbar sind, vermutlich eine phenolische OH und eine $COOH$ -Gruppe, daß zudem eine phenolische OH glykosidisch verschlossen ist und eine weitere methyliert vorliegt ($-OCH_3$ analog Physcion). Die übrigen beiden stellen die chinoiden Carbonylfunktionen dar.

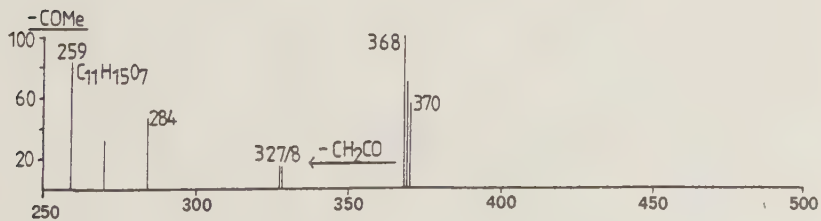
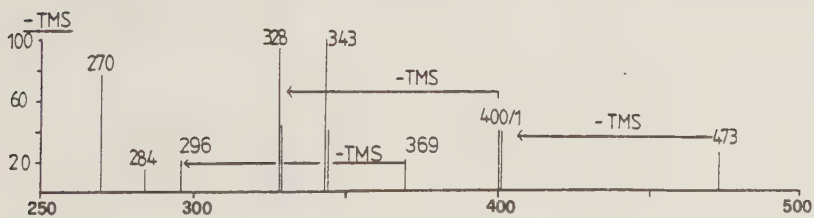
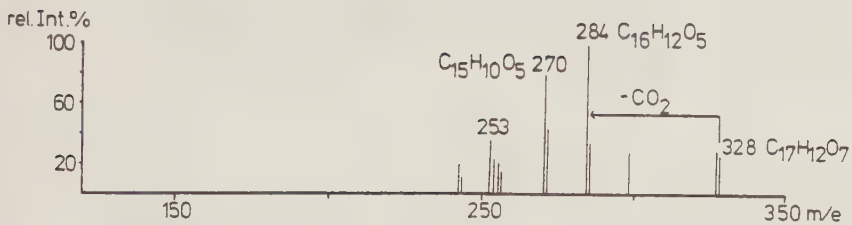
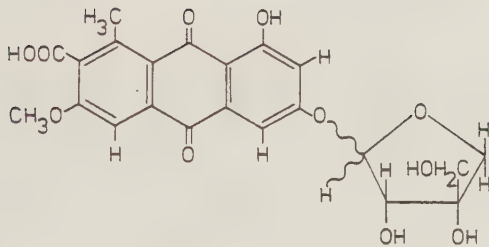


Abb.26: EI-MS von Alp VI und dessen TMS- und Acetyl-Derivaten

3.2.6. IR-Spektroskopie

Das IR-Spektrum (Abb.27) läßt die auf Carbonsäuren, aber auch auf 1.8-Dihydroxyanthrachinone deutenden scharfen Banden der OH-Streckschwingungen bei $2800-2900\text{ cm}^{-1}$ erkennen²². Daneben erscheint eine Bande bei 1630 cm^{-1} (C=O mit peri-ständiger OH-Gruppe) und eine schwach ausgeprägte Bande bei 1710 cm^{-1} (Carbonylbande der Carbonsäure). Die bei Anthrachinonen üblicherweise auftretende zweite, schwache Bande der unchelatisierten C=O-Streckschwingung bei ca. 1675 cm^{-1} ist im vorliegenden Spektrum nicht deutlich differenziert. Bei 1580 cm^{-1} findet sich die Bande der C=C-Streckschwingung.

3.2.7. ^1H -NMR-Spektroskopie

Das ^1H -NMR-Spektrum wurde in DMSO-d_6 und $\text{DMSO-d}_6/\text{CF}_3\text{COOD}$ aufgenommen (TMS/ppm) (Abb.28 - 31). Anzumerken bezüglich der Stabilität von Alp VI ist, daß es in diesem Lösungsmittel nach der Messung zum Teil zersetzt vorlag.

Für das Anthrachinonaglykon erscheinen im Bereich der aromatischen Protonenverschiebungen 3 Signale für jeweils 1 Proton: 1 Singulett bei 7.62 ppm, 2 Dubletts für meta-ständig angeordnete Protonen bei 7.23 ppm ($J=2.5\text{ Hz}$) und bei 6.85 ppm ($J=2.5\text{ Hz}$). Darüberhinaus erscheinen 2 Singuletts für jeweils 3 Protonen bei 3.98 ppm (aromat. $-\text{OCH}_3$) und bei 2.66 ppm (aromat. $-\text{CH}_3$) sowie ein Singulett für 1 Proton bei 12.97 ppm (chel. OH). Nach Zugabe von CF_3COOD tauscht das Signal für die chelat. OH-Gruppe aus. Die Signale für den Zuckeranteil zeigen das Vorliegen eines ungewöhnlichen Zuckers, nämlich der Apiose (vgl. Frangulin [19, 20]). Das für O-Glykoside charakteristische Tieffeldsignal des anomeren Protons findet sich bei 5.69 ppm ($J=3.5\text{ Hz}$). Sein Kopplungs-

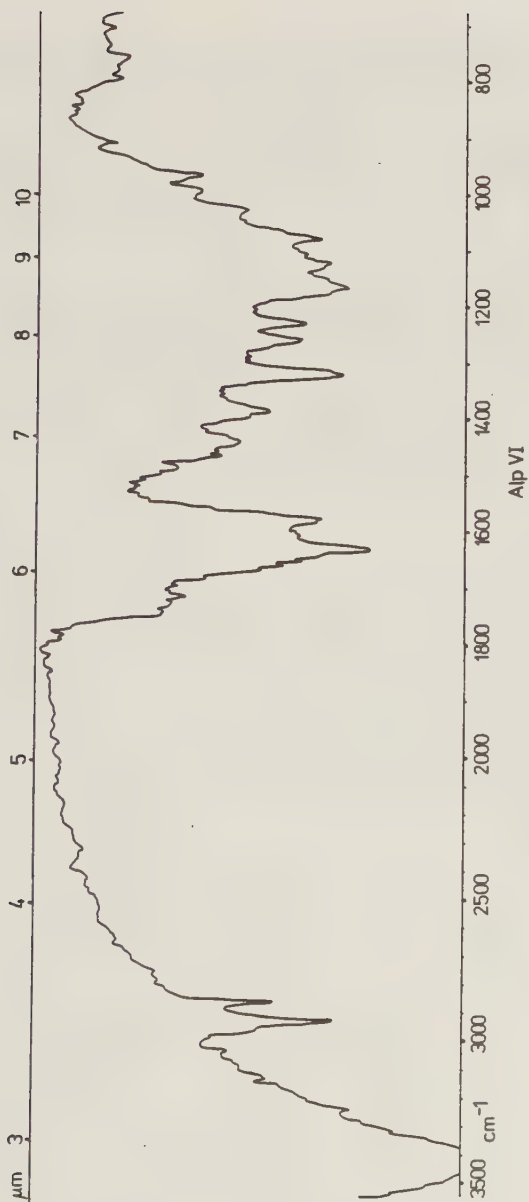
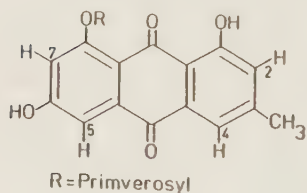


Abb.27: IR-Spektrum von Alp VI

partner H-2' erscheint als Dublett bei 4.25 ppm ($J=3.5$ Hz). H-2' läßt keine weiteren Kopplungspartner erkennen, so daß C-3' zweifach substituiert vorliegen sollte. Dementsprechend sind zwei Signale mit dem Kopplungsmuster eines AB-Systems zu beobachten, nämlich die für die Methylenprotonen an C-4' bei 4.12 ppm ($J=9.5$ Hz) und bei 3.81 ppm ($J=9.5$ Hz) sowie zwei Dubletts für die Methylenprotonen an C-5' (ebenfalls AB-Syst.) bei 3.40 ppm ($J=13$ Hz) und bei 3.47 ppm ($J=13$ Hz). Darüberhinaus finden sich drei verbreiterte Singuletts für die Zuckerhydroxyle bei 4.88 ppm, 5.00 ppm und 5.61 ppm, welche nach Zugabe von CF_3COOD austauschen. Sämtliche Daten entsprechen denen des Apiofuranosyls ²⁰.

Weitere Befunde bezüglich des Substitutionsmusters der Aglykonkomponente ergeben sich zum einen aus der Kopplungskonstante der metaständigen, aromatischen Protonen von $J=2.5\text{Hz}$. Die Größe der Kopplungskonstanten metaständiger, aromat. Protonen ist abhängig vom Substituenten zwischen ihnen. Ein elektronenziehender Substituent ($-\text{OCH}_3$ oder $-\text{O-Zucker}$) führt zu einer Kopplungskonstanten von 2-3 Hz, ein elektronenschiebender Substituent (z.B. $-\text{Alkyl}$) zu einer kleiner als 1 Hz bzw. die Protonensignale erscheinen als verbreiterte Singuletts. Als Beispiel sei dies beim Emodinprimverosid gezeigt ⁵¹ (Tabelle 4).



Tab.4: ¹H-chem. Verschiebungen u. Kopplungskonst. der aromat. H des Emodinprimv.

	chem. Versch. (ppm)		J (Hz)
H-2	7.15	s	verbr.
H-4	7.46	d	1
H-5	7.29	d	2.3
H-7	7.08	d	2.3

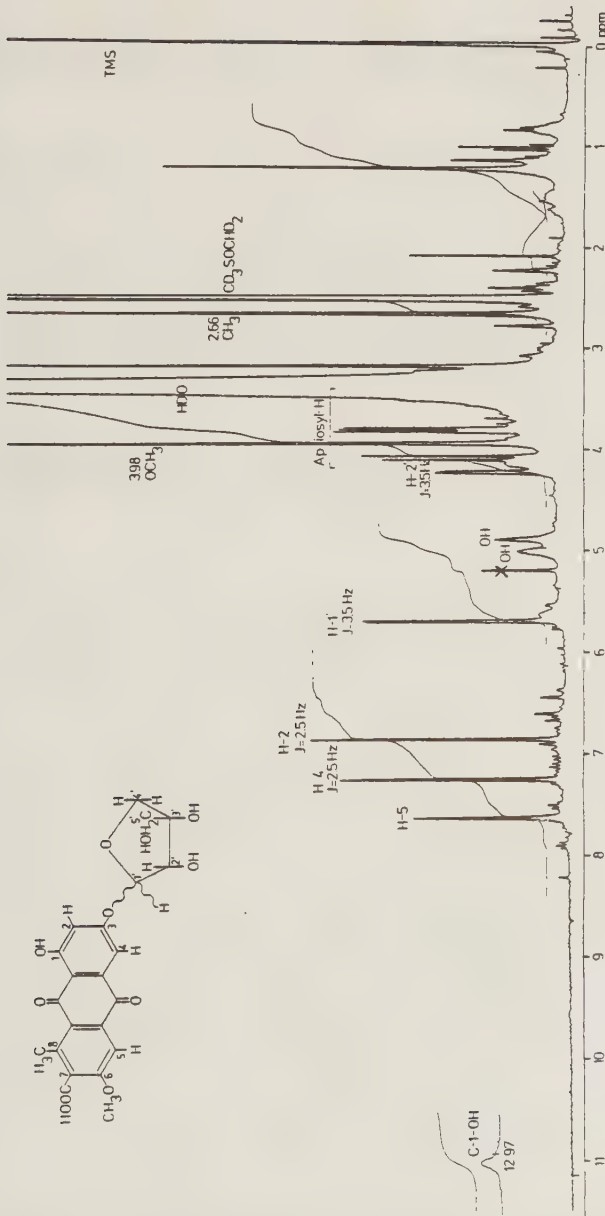


Abb.28: ^1H -NMR (270 MHz/ DMSO-d_6 /TMS/ppm) : Alp VI

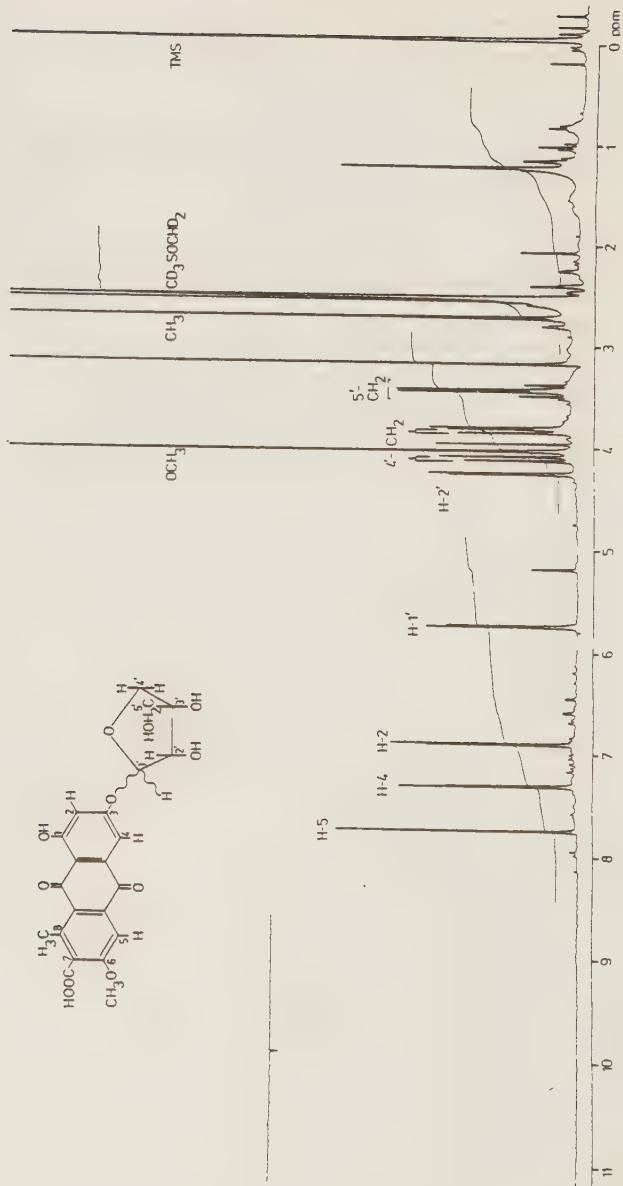


Abb.29: ^1H -NMR (270 MHz/ DMSO-d_6 + CF_3COOD /TMS/ppm) : A1p VI

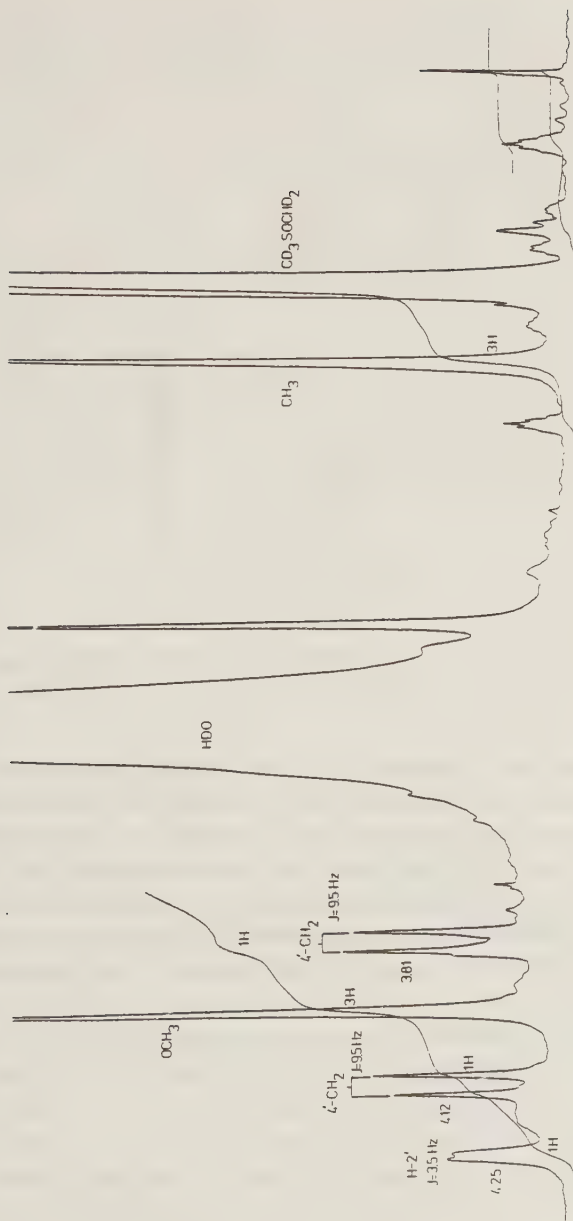


Abb.30: Spreizung des ^1H -NMR-Spektrums von Alp VI (Abb.28) im Bereich von 0 - 4.25 ppm

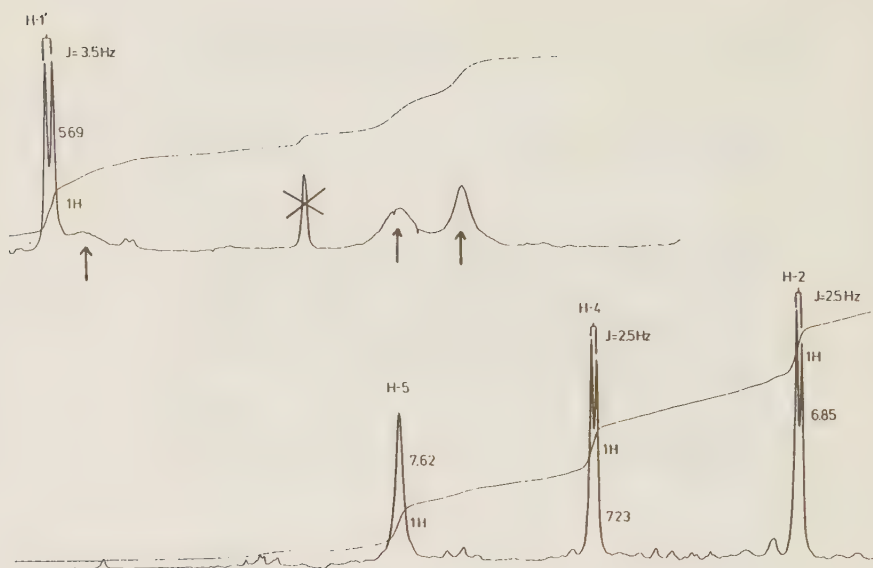
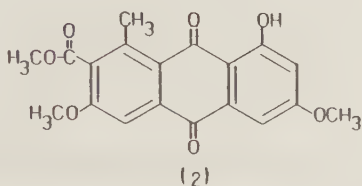
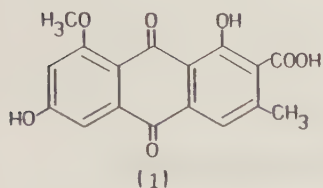


Abb.31: Spreizung des ^1H -NMR-Spektrums von Alp VI im Bereich von 5.69 – 7.62 ppm ($\uparrow$ OH-Protonen der Apiose)

Es muß also im vorliegenden Fall ein elektronenziehender Substituent zwischen beiden aromatischen Protonen sein. Zum anderen gibt die chemische Verschiebung der aromatischen Methylgruppe von 2.66 ppm einen deutlichen Hinweis auf ihre Position am Anthrachinongrundgerüst. Diese deutliche, außergewöhnliche Tieffeldverschiebung des Signals im Vergleich zu sonst üblichen Werten in Anthrachinonen (z.B. Alp IV: Ar-CH_3 bei 2.31 ppm) ist charakteristisch für eine im Verhältnis zur Carbonylfunktion α -ständige Methylsubstitution in Alp VI. Im Zusammenhang mit dieser Fragestellung und wegen mangelnder Literaturdaten wurde das ^1H -NMR-Spektrum einer zunächst als mögliches Aglykon von Alp VI in Frage kommenden Verbindung aufgenommen, nämlich das des Dermoluteins (1) $^{+)}$ aus dem Pilz *Dermocybe sanguinea* (Wulf.

$^{+)}$ Herrn Prof. Dr. Steglich danke ich sehr für die Übersendung einer Probe des Dermoluteins!

ex Fr.)⁴⁰ (Abb.32). Zusätzlich wurden die ¹H-NMR-Daten des Dimethylethers des Laccainsäure D-methylesters (2)⁴¹ herangezogen (Tabelle 5).



Tab. 5: Chemische Verschiebungen aromatischer Methylgruppen

Verbindung	chem. Verschiebung (ppm)
(1) (Abb.32)	2.28
(2) ⁴¹	2.70
Alp VI	2.66
Alp V	2.30

Wie aus Tab.5 hervorgeht, zeigen α -ständige Methylgruppen eine deutliche Tieffeldverschiebung gegenüber β -ständigen. Demnach handelt es sich bei Alp VI um ein α -Methyl-Derivat. Die endgültige Klärung des Substitutionsmusters von Alp VI sowie die Ermittlung der Verknüpfungsstelle des Zuckers und auch der endgültige Nachweis der Zuckerkomponente sollte nach Hydrolyse des Anthraglykosids Alp VI möglich sein.

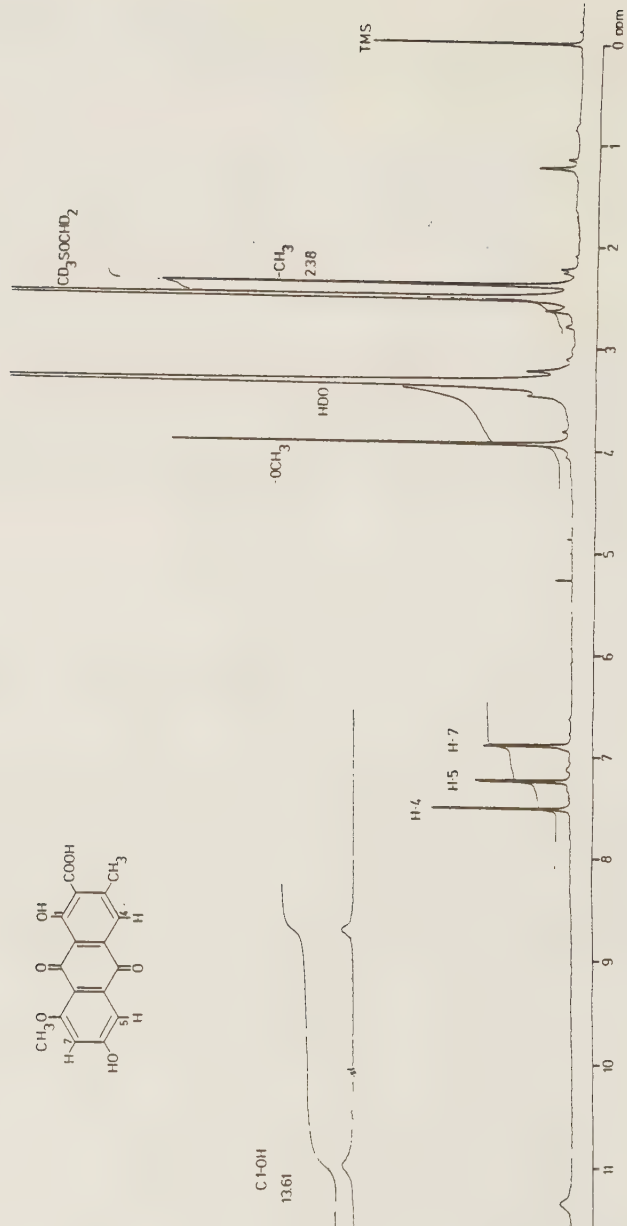


Abb.32: ¹H-NMR (270 MHz/DMSO-d₆/TMS/ppm): Dermolutein

3.2.8. Hydrolysebefunde von Alp VI

In der Annahme des Vorliegens einer O-glykosidischen Verknüpfung ($^1\text{H-NMR}$) zwischen Aglykon und Zucker wurde eine saure Hydrolyse durchgeführt. Aus dem Hydrolyseansatz wurden durch Verteilung zwischen Essigester und Wasser Aglykon und Zucker getrennt.

Zum direkten Vergleich von Glykosid und den Hydrolyseprodukten werden die folgenden Eigenschaften angegeben:

Alp VI: FM: Essigester:Methanol:Wasser (100:17:13)
 Rf-Wert: 0.14
 Detektion: Tageslicht gelb
 Fluoreszenzlösung bei 254 nm
 hellrote Fluoreszenz bei 366 nm
 Detektion nach Besprühen mit 5% KOH-Lösung:
 Tageslicht hellrot
 Fluoreszenzlösung bei 254 nm
 rötliche Fluoreszenz bei 366 nm

Alp VIa (=Aglykon von Alp VI):

FM: Cyclohexan:Methylenchlorid:Ethylformiat:Ameisensäure
 (35:30:30:5)
 Rf-Wert: 0.56
 Detektion: Tageslicht gelb
 Fluoreszenzlösung bei 254 nm
 rote Fluoreszenz bei 366 nm
 Detektion nach Besprühen mit KOH-Lösung:
 Tageslicht orange
 Fluoreszenzlösung bei 254 nm
 hellrote Fluoreszenz bei 366 nm

Zuckeranteil: FM: n-Butanol:Essigsäure:Ether Wasser (9:6:3:1)

Rf-Wert: 0.35

Detektion nach Besprühen mit Anisaldehyd/ H_2SO_4 -Lsg.:

Tageslicht schwach bräunlich

hellgrüne Fluoreszenz bei 366 nm (verschwindet nach ca. 30 min)

3.2.8.1. Untersuchung des Zuckeranteils von Alp VI

Nachdem die ^1H -NMR-spektroskopischen Daten auf das Vorhandensein eines Apiofuranosylanthraderivats hinwiesen, bestätigte auch der DC-Vergleich des nach der sauren Hydrolyse von Alp VI erhaltenen Zuckers das Vorliegen der Apiose. Als Vergleich dienten die Zuckeranteile Apiose und Rhamnose aus dem Hydrolysat der Franguline A (=Frangulaemodin-6-O-rhamnosid) und B (=Frangulaemodin-6-O-apiosid). Darüberhinaus läßt sich die Apiose UV-spektroskopisch nach Sandermann ⁴² nach Umsetzung mit Schwefelsäure, Fruktose und Cystein-HCl spezifisch identifizieren (Tab.6) :

Tab.6: UV-Absorptionen des Apiosenachweises nach Sandermann:

Reaktion (s. exp. Teil)		Literatur- ⁴² werte: λ_{max}	Gefundene Werte: λ_{max}
1	Apiose+ H_2SO_4	276.5 nm	278 nm
2	Apiose+ H_2SO_4 +Fruktose	449 nm	450 nm
3	Apiose+ H_2SO_4 +Fruktose +Cystein-HCl	463 nm	458 nm

Der Vergleich der gefundenen Absorptionsmaxima mit den entsprechenden Literaturangaben der Apiose zeigt vollständige Übereinstimmung. Die Abbildungen 33 und 34 zeigen die erhaltenen UV-Spektren.

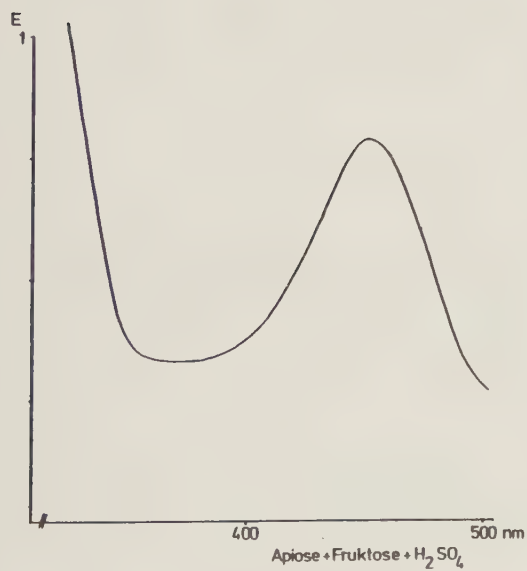
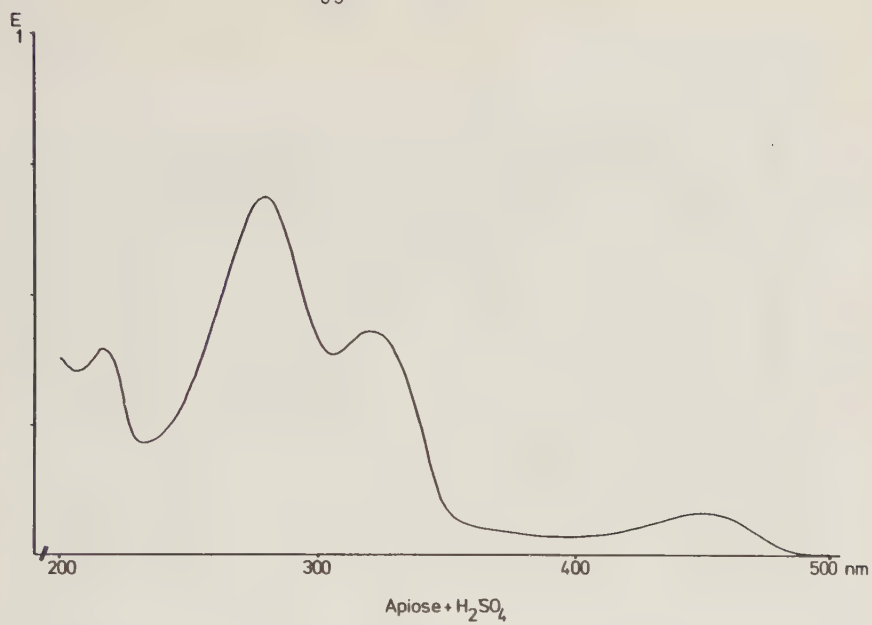


Abb.33: UV-Spektren von Apiose nach Reaktion 1 bzw. 2

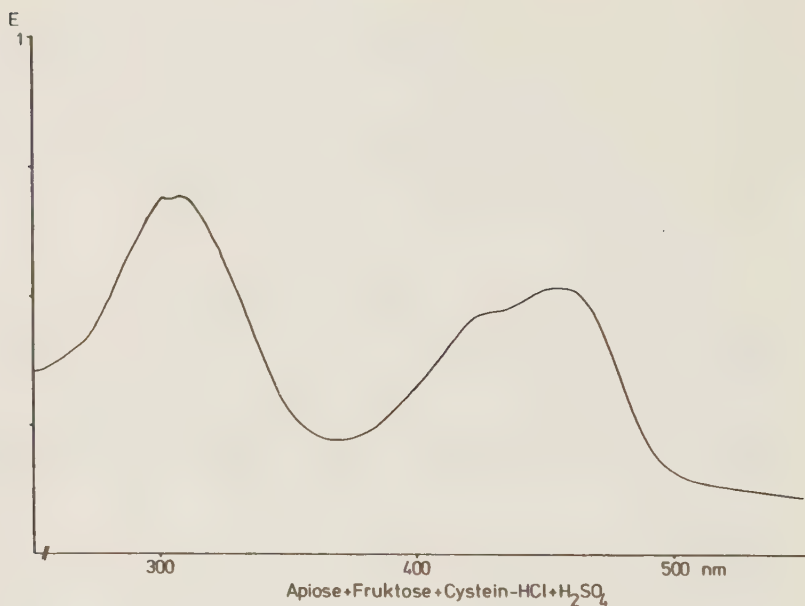
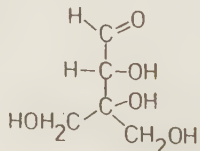


Abb.34: UV-Spektrum der Apiose nach Reaktion 3

Exkurs: Biochemie der Apiose

Vorkommen

Es handelt sich bei der Apiose um eine verzweigt-kettige Aldopentose, die erstmals im Jahr 1901 in Petroselinum-Arten (Apiaceae) als Bestandteil des Flavonolglykosids Apiin⁴³ gefunden wurde:



Duff ⁴⁴ untersuchte die Hydrolysate von 175 Pflanzen aus 100 Familien und berichtete, in ungefähr der Hälfte dieser Pflanzen Apiose gefunden zu haben. Über ein noch verbreiteteres Vorkommen berichten Watson und Orenstein ⁴⁴. Grisebach ⁴⁴ hingegen hält aufgrund des ähnlichen chromatographischen Verhaltens von Apiose, Rhamnose, Fucose und Ribose diese Angaben nicht für gesichert.

In der Familie der Rhamnaceen kommt Apiose in den Glykosiden Frangulin B und dessen Primärglykosid Glukofrangulin B vor, die sicher bisher nur in *Rhamnus frangula* identifiziert worden sind ²⁰. Es ist dies u.W. das einzige, bisher bekannte Vorkommen der Apiose in Anthracenglykosiden. Es ist zudem einer der wenigen Fälle (vgl. 20, 45), in denen die Apiose direkt am Aglykon und nicht endständig im Diglykosid gebunden vorliegt.

Biosynthese

In dem am weitesten verbreiteten Apiose enthaltenden Glykosid Apiin liegt die Apiose in der D-erythro-furanose-Form vor ⁵⁰. Grisebach ^{44,46} nimmt an, daß Apiose ausschließlich in der D-Konfiguration vorkommt, da als Apiose-Überträger nur UDP-D-apiose gefunden werden konnte.

Die Apiose ist ein Produkt des D-Glukuronsäurestoffwechsels ⁴⁴. UDP-Glukuronsäure wird mittels enzymatisch gebundenem NAD^+ (ENAD^+) zum entsprechenden 4-Keto-Derivat oxidiert. Anschließend wird decarboxyliert und nach Ringverengung in Form einer Retro-aldol-Spaltung entsteht nach Reduktion UDP-D-apiose bzw. nach Reduktion und ohne Ringverengung UDP-D-xylose. Das C-3 der Glukuronsäure wird dabei zum C-5 der Apiose. Die Tatsache, daß nur ein entsprechendes, bifunktionelles Enzym, für das Grisebach und Mitarbeiter den Namen UDP-apiose/UDP-xylose-Synthetase vorschlagen, für die Biosynthese der Apiose und Xylose verantwortlich ist, zeigt deren enge biogenetische Verbindung (Abb.35).

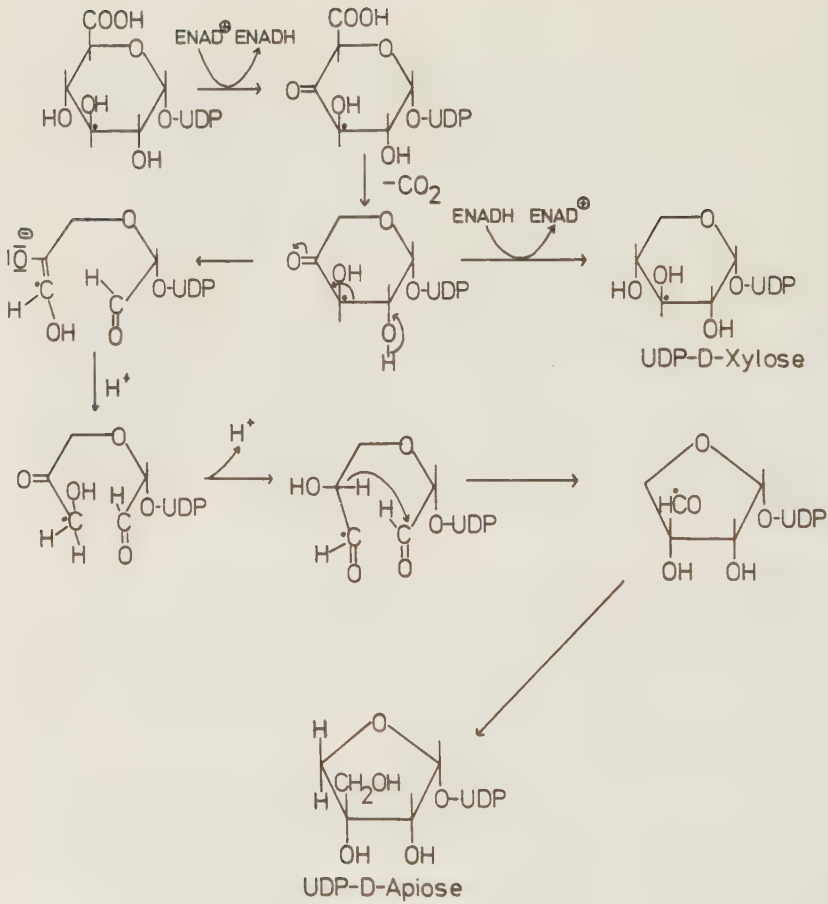


Abb.35: Biosynthese der D-Apiose und D-Xylose ausgehend von D-Glukuronsäure (entnommen 44)

3.2.8.2. Zur Konfiguration der Apiose in Alp VI

D-Apiose kann als Furanosid in vier möglichen Isomerenformen vorliegen ⁴⁷ (Abb.36):

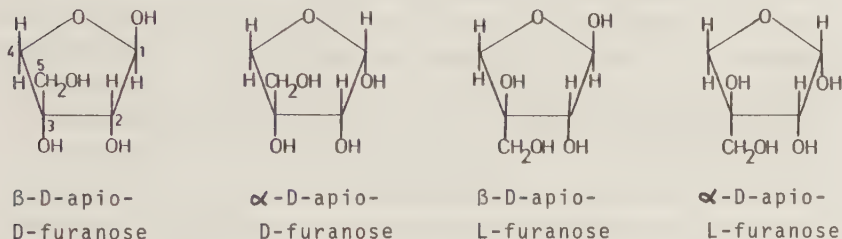


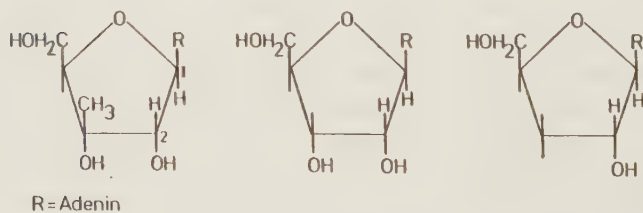
Abb.36: 4 Isomere der D-Apiofuranose

Eine über die Zuordnung zur D-Furanose-Reihe, aufgrund der bisher ausschließlich aufgefundenen UDP-D-Apiose, hinausgehende Ermittlung der anomeren Konfiguration in Alp VI ist nicht möglich, da die entsprechenden Literaturangaben hierzu unvollständig und zum Teil einander widersprechend sind (vgl. 20, 52, 53).

Bei Alp VI wurde eine Molekulardrehung von $[M] = -61^0$ gemessen. Bei Anwendung der Klyne'schen Regeln ⁴⁸ und Zugrundelegung der Zugehörigkeit zur D-Reihe würden das Vorliegen eines β -D-Apiofuranosylanthrachinonderivats vermuten lassen. Die Klyne'schen Regeln sind aber nur für Pyranoside definiert ⁴⁸. Inwieweit eine Anwendung auch auf Furanoside möglich ist, ist ungeklärt ⁴⁶. Im Arzneibuchkommentar ³ sowie in einem einschlägigen Buch der Sekundärliteratur ²¹ wird für die Apiose im Frangulin B die Konfiguration eines α -L-Apiofuranosyls angegeben. Zu einer vergleichenden Untersuchung wurde Frangulin B aus einem Gemisch der Franguline A + B mittels DCC-Chromatographie (s. exp.

Teil) isoliert. Wegen Substanzmangels konnte dann nur ein qualitativer, negativer Wert für das molekulare Drehvermögen ermittelt werden. Die Zuordnung zur α -L-Reihe würde danach bei Gültigkeit der Klyne'schen Regeln möglich sein, da diese Regeln bei negativem, molekularem Drehvermögen das Vorliegen von α -L- oder β -D-Konfiguration ergeben. Es konnte keine Literaturangabe gefunden werden, aufgrund welcher Überlegungen oder Experimente das ursprünglich der β -D-Reihe zugeordnete Frangulin B²⁰ nun der α -L-Reihe zugeordnet wird.

Mabry und Mitarbeiter isolierten aus *Lepidagathis cristata* (Acanthaceae) ein 6-Hydroxyluteolin-7-O-apiosid⁴⁵, wobei sie zur Konfiguration der Apiose keine Angaben machten. Die Kopplungskonstante der Protonen an C-1 und C-2 betrug wie im Apioseanteil von Alp VI $J=3.5$ Hz. Auch die übrigen Signale entsprachen den von uns gefundenen. Aber selbst aus diesen Angaben läßt sich keine genaue Konfiguration mindestens an C-1 und C-2 ermitteln, wie Messungen an unterschiedlich an C-3 substituierten Furanosiden zeigten (aus [49]) (Abb. 37).



$$J_{H-1,H-2} = 8.2 \text{ Hz}$$

$$6.0 \text{ Hz}$$

$$2.3 \text{ Hz}$$

Abb.37: Vergleich der Kopplungskonstanten $J_{H-1,H-2}$ unterschiedlich substituierter Furanoside

Unter Zuhilfenahme aller eigenen Daten und im Vergleich mit den zur Verfügung stehenden Literaturangaben erscheint die exakte Konfigurationszuordnung nicht möglich. Aufgrund der biogenetischen Gegebenheiten ist aber das Vorliegen eines D-apiofuranosyl-Derivats sehr wahrscheinlich.

3.2.8.3. ^1H -NMR-Spektroskopie der Aglykonkomponente von Alp VI

Die ^1H -NMR-chemischen Verschiebungen von Alp VI ergeben zusammen mit den UV/VIS-, IR- und MS-Daten zunächst das Vorliegen eines Anthrachinongrundkörpers, der mit einer periständigen Hydroxylgruppe (12.97 ppm), einer α -Methylgruppe (2.66 ppm), einer Methoxylgruppe (3.98 ppm), einer Carbonsäurefunktion und einer mit Apiose glykosidisch verknüpften Hydroxylgruppe substituiert ist. Die Daten des ^1H -NMR-Spektrums des nach der sauren Hydrolyse von Alp VI erhaltenen Aglykons Alp VIa bestätigen dies. Zusätzlich erscheint bei 10.13 ppm ein Signal für eine phenolische, nicht chelatisierende Hydroxylgruppe, welches nach Zusatz von D_2O austauscht (Abb. 38 und 39). An diese β -ständige Hydroxylgruppe muß somit in Alp VI die Apiose gebunden sein.

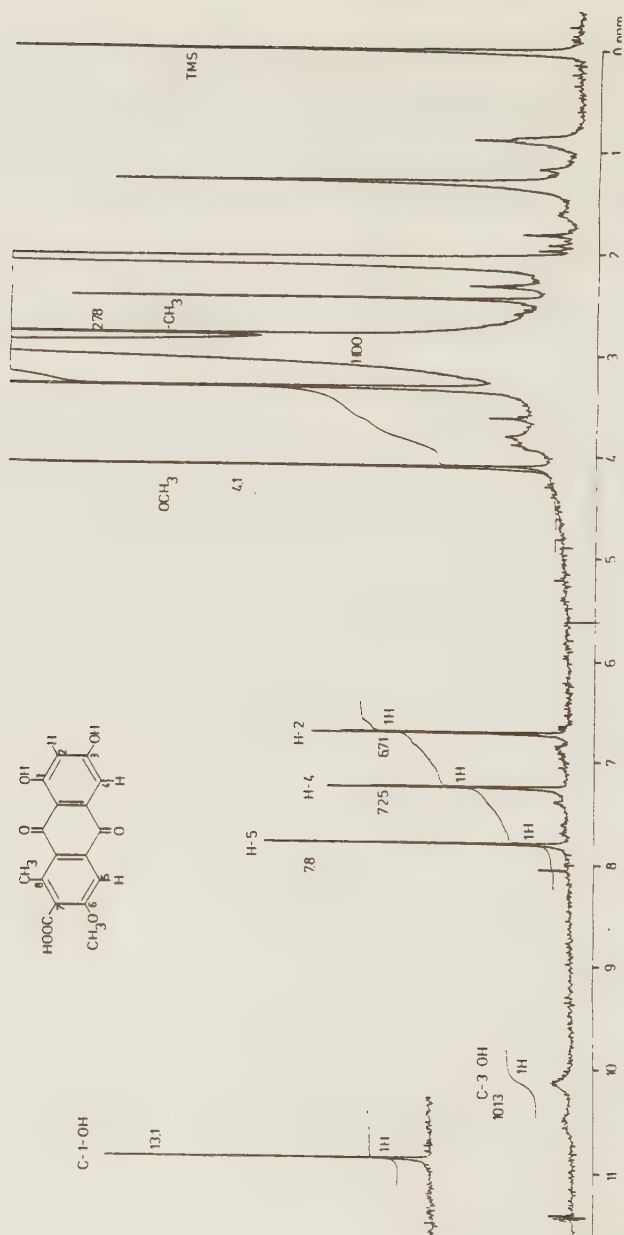


Abb.38: ¹H-NMR (250 MHz/DMSO-d₆/TMS/ppm) : Alp VIa

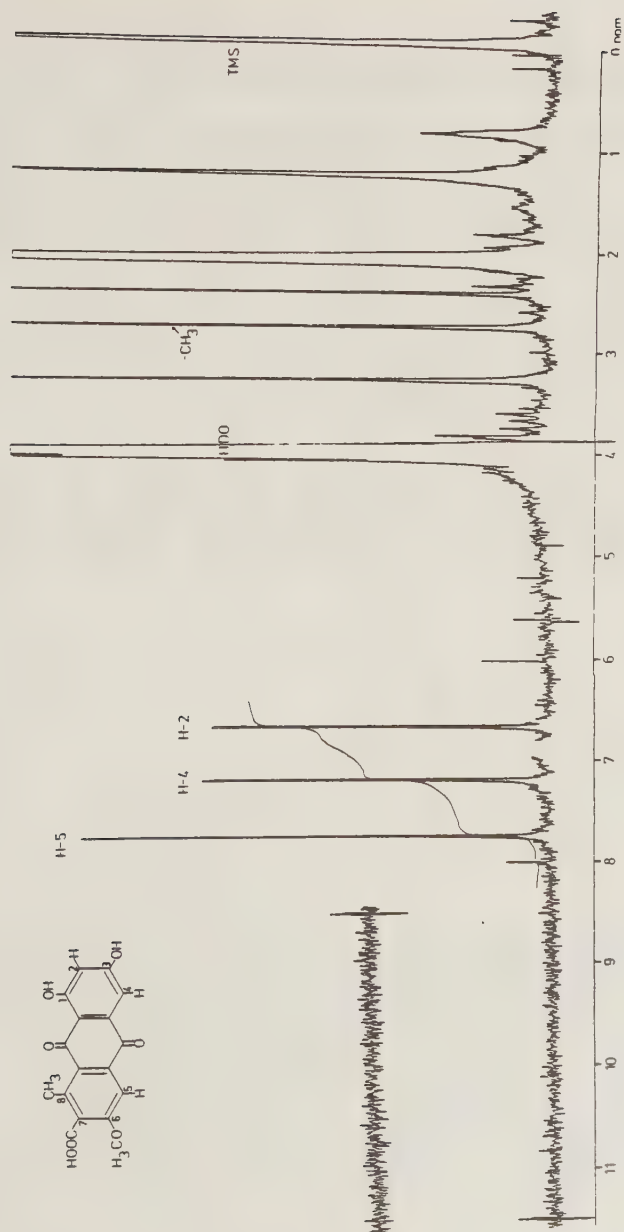
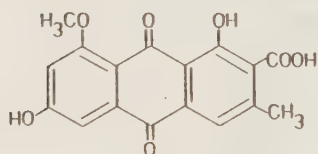


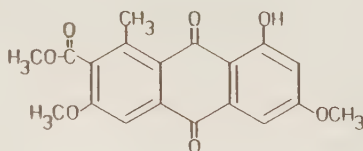
Abb. 39: ^1H -NMR (250 MHz/DMSO- d_6 + D_2O /TMS/ppm) : Alp VIa

3.2.9. UV/VIS-Analyse verschieden substituierter Anthraderivate

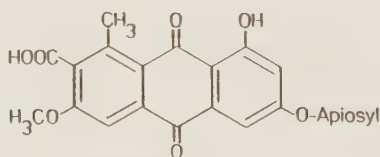
Eine den bisherigen Überlegungen gleichwertige Bestimmung des Substitutionsmusters von Alp VI als eines 1-Hydroxy-8-methylanthrachinonderivatsergibt eine UV/VIS-Untersuchung der in Frage kommenden Chromophoren. Dabei sollen den UV/VIS-Daten von Alp VI und Alp VIa diejenigen einer 1.8-Dihydroxy-anthrachinoncarbonsäure, hier des Dermoluteins (1), und eines dem Alp VI ähnlich substituierten 1-Hydroxy-8-methyl-anthraderivats, hier des Dimethylethers des Laccainsäure Dimethylesters (2) ⁴¹, gegenübergestellt werden.



(1)



(2)



Alp VI

Sowohl (1), (2) und Alp VI und sein Aglykon können als kreuzkonjugierte Acetophenon-Benzochinon-Derivate betrachtet ⁵² werden, die allerdings unterschiedlich hydroxysubstituiert sind: (1) besitzt zwei ortho-Hydroxyacetophenon Teilstrukturen, (2) nur eine und zusätzlich eine para-Hydroxyacetophenon Teilstruktur. Die UV-Spektren von o- bzw. p-Hydroxyacetophenon unterscheiden sich durch ein zusätzliches Maximum im langwelligen Bereich von 320-360 nm beim o-Hydroxy-derivat (Abb.40).

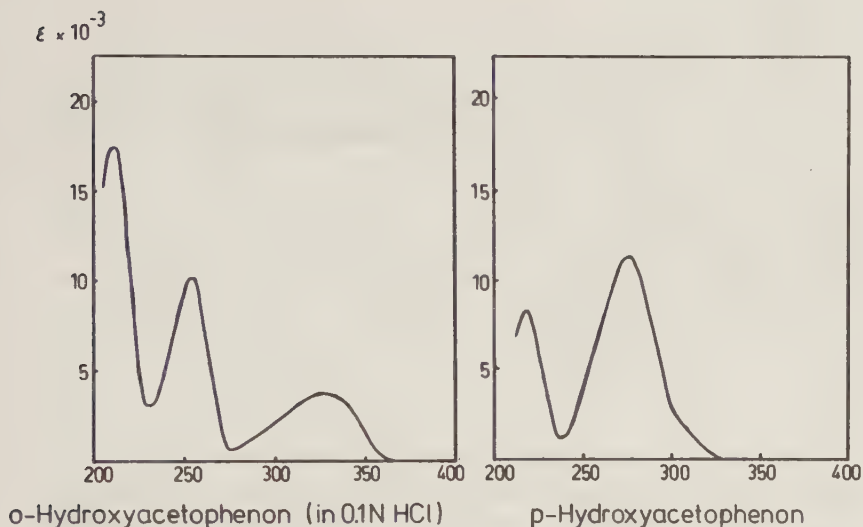


Abb.40 : UV-Spektren von o- u. p-OH-Acetophenon (entnommen 52)

Der UV/VIS-Datenvergleich, dargestellt in Tabelle 7, zeigt schließlich die Unterschiede beider Chromophor-Typen (1) und (2) hinsichtlich ihrer Absorptionsintensitäten ϵ im langwelligen Bereich, die bei einem α -Methylderivat deutlich schwächer sind. Diese Befunde und die Daten von Alp VI und dessen Aglykon erlauben eindeutig diese beiden ebenfalls dem Chromophor eines α -Methylderivats, also wie (2), zuzuordnen.

Tab.7: UV/VIS-Datenvergleich

Verbindung	$\lambda_{\max 1}$ (lg ϵ)	$\lambda_{\max 2}$ (lg ϵ)	$\frac{E_1}{E_2}$
(1) (Abb.41)	275	432	2.7
(2) ⁵⁹	270(3.3), 280(3.3)	425(2.5)	6.8
Alp VI	284.5(3.76)	416(2.85)	8.3
Alp VIa (Abb.42)	283	429	10.1

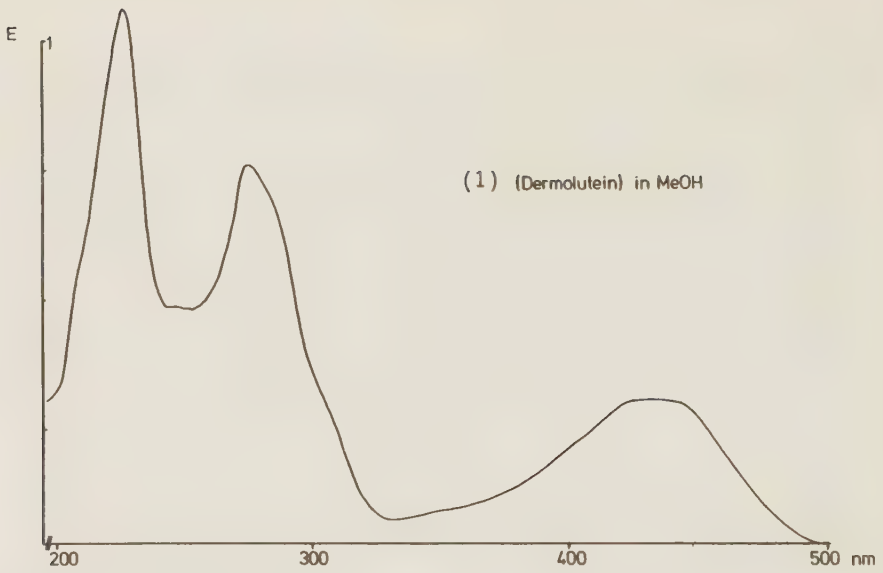


Abb.41: UV/VIS-Spektrum von (1)

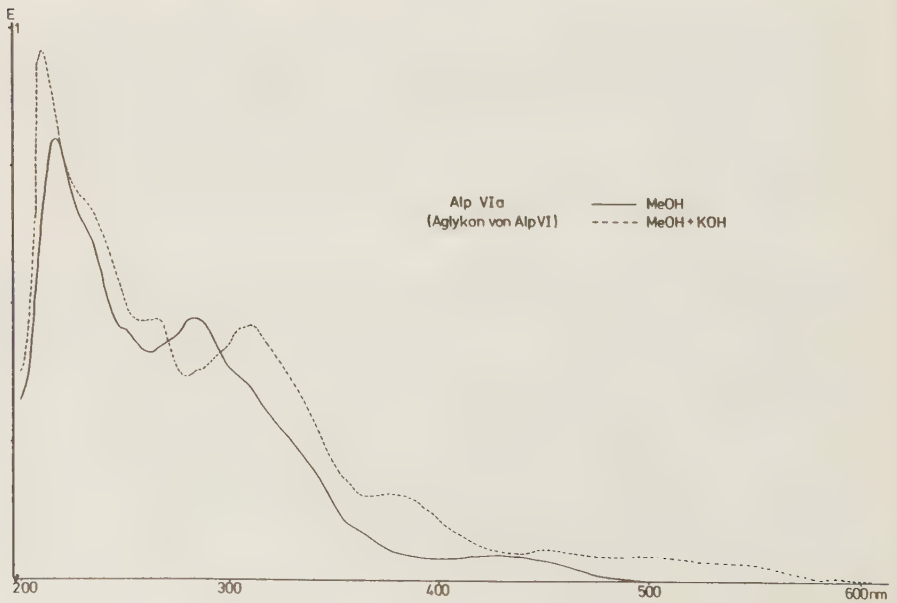
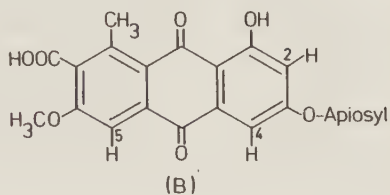
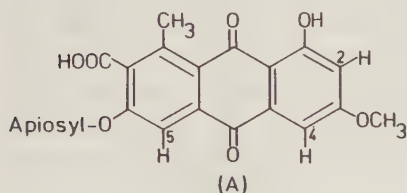


Abb.42: UV/VIS-Spektrum von Alp VIa

3.2.10. NOE-Experiment

Mit allen bisherigen spektroskopischen Daten stehen die beiden Strukturen (A) und (B) in Einklang :



Die Entscheidung zwischen diesen beiden sollte durch ein Einstrahlexperiment unter Beobachtung des sog. Nucleus-Overhauser-Effekts (NOE) ⁵³ möglich sein.

Magnetische Kerne erfahren in einem starken magnetischen Feld eine Gleichgewichtseinstellung auf unterschiedlichen Spinnenergie-Niveaus. Dieser Vorgang, Relaxation, genannt, ist stark von Dipolwechselwirkungen mit anderen Kernen beeinflusst. Eine Störung der Gleichgewichtseinstellung durch Einstrahlen der Frequenz der entsprechenden chemischen Verschiebung eines Protons kann bei einem benachbarten Kern ebenfalls zu einer Veränderung des Gleichgewichts führen. Dies macht sich experimentell in einer Veränderung der Signalintensität, meistens einer Verstärkung von ca. 15-35% (aber auch eine Verminderung der Intensität ist möglich) bemerkbar ⁵³. Im vorliegenden Fall sollte durch Einstrahlen der Methoxylresonanz (3.98 ppm) entweder eine Veränderung der Signalintensitäten der Protonen H-2 und H-4 ⁴¹ bei (A) oder eine Veränderung des Singulettts von H-5 bei (B) beobachtbar sein. Die Aufnahme eines 2d-NOE-Spektrums ⁺) (Abb.43) ergab einen starken Effekt (ca. 35%) auf das Singulett mit der chemischen Verschiebung von 7.62 ppm, also H-5, während

⁺) Herrn Dr. Spraul, F. Bruker Karlsruhe, danke ich sehr für Aufnahme des 2d-NOE-Spektrums.

H-2 und H-4 unbeeinflusst blieben. Somit konnte die Struktur (A) für Alp VI ausgeschlossen werden.

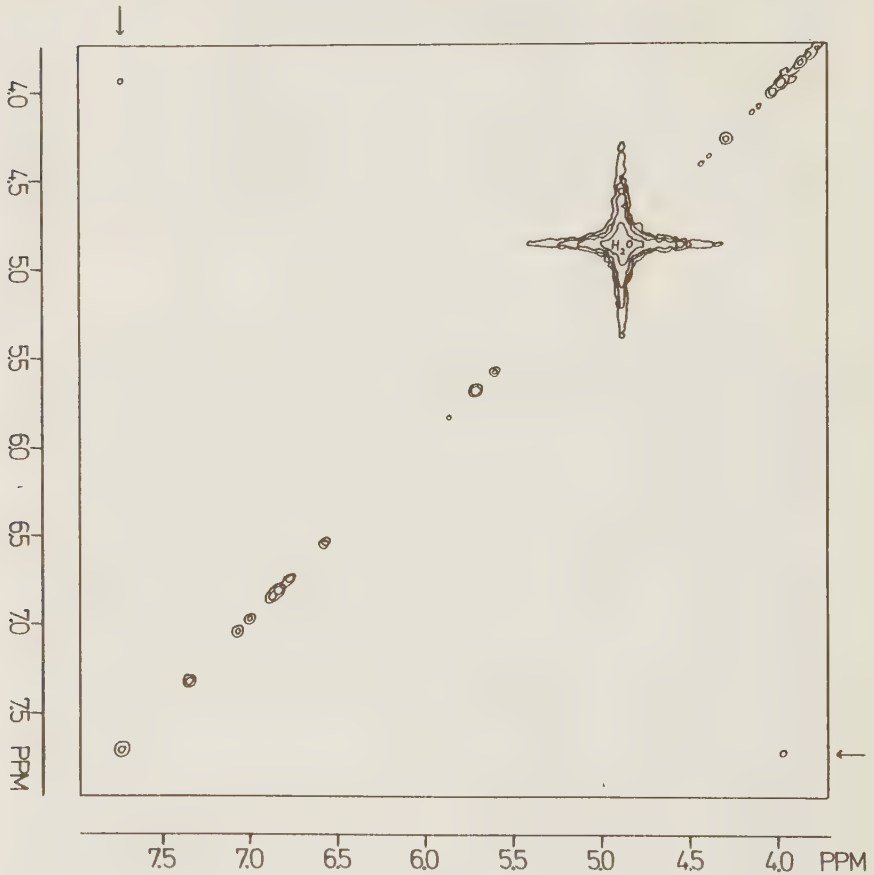


Abb. 43: 2d-NOE-Spektrum (Ausschnitt 3.6 - 8 ppm)

Die in der zweidimensionalen Darstellung auftretenden cross peaks (Pfeile) verbinden die durch den NOE-Effekt beeinflussten Signale des auf der Diagonalen dargestellten

^1H -NMR-Spektrums. Im vorliegenden Fall erscheint nur ein cross peak (Pfeil), der die Signale bei 3.98 ppm (aromat. Methoxylgruppe) und 7.62 ppm (H-5) miteinander verbindet.

Zum Vergleich sind in Abb.44 am Beispiel des Dimethylethers des Laccainsäure D-methylesters ⁴¹ die NOE-Effekte, die durch Einstrahlen der Methoxylresonanzen auf die benachbarten Protonen ausgeübt werden, dargestellt. Zu beachten ist hierbei auch die Stärke der Effekte, nämlich 35% beim Einfluß auf ein Proton und 18% bzw. 20% bei gleichzeitigem Einfluß auf zwei Protonen.

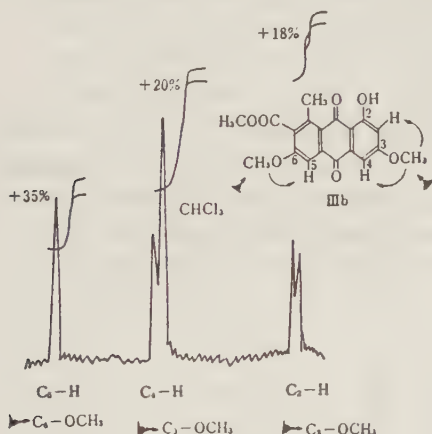


Abb.44; NOE-Effekte (entnommen [41])

Eine letzte, mögliche, biogenetisch allerdings äußerst unwahrscheinliche, Strukturvariante von Alp VI stellt die einer 2-O-apiofuranosyl-4-hydroxy-Substitution des Rings C dar, die ebenfalls den o.a. spektroskopischen Befunden genügt. Zur Zeit wird mit Hilfe eines ^{13}C -NMR-H-gekoppelten Spektrums versucht, dies zu klären. Die entsprechenden Untersuchungen sind dadurch erheblich erschwert, daß von diesem Strukturtyp keine ^{13}C -NMR-Signalu Zuordnungen vorliegen und Berechnungen mit Hilfe additiver Inkremente unklar sind.

3.3. HPLC-Nachweis und -Gehaltsbestimmung von Rhamnalpinosid (=Alp VI), dem Leitstoff der Fallaxrinde gemäß Ph. Eur. II

Bei der Extraktion der Droge zur Gewinnung der Untersuchungslösung wurde die Tatsache, daß es sich bei Alp VI um eine Anthrachinoncarbonsäure handelt, dahingehend ausgenutzt, daß mit Phosphatpuffer (pH 7.4) ⁴⁰ gearbeitet wurde.

5.0 g Droge (fein gepulvert) wurden quantitativ (DC-Kontrolle) mit ca. 300 ml Phosphatpuffer perkoliert. Das Perkolat wurde auf genau 300.0 ml Lösung ergänzt. 30.0 ml Perkolat werden mit 3 ml 1n HCl auf ca. pH 2 angesäuert (Farbumschlag von rot (Phenolat) nach gelb (Phenol)). Die 33 ml werden 4x mit je 60 ml Essigester ausgeschüttelt. Die Essigesterphasen werden eingeengt und der Rückstand in 5.0 ml MeOH aufgenommen. Diese Lösung wird als Meßlösung verwendet. In der verbliebenen Perkolatlösung war nach Einengen und Aufnehmen in MeOH mit Hilfe der HPLC kein Alp VI nachweisbar. Die Ergebnisse der Gehaltsbestimmung sind in Tabelle 8 und Abb. 45 dargestellt.

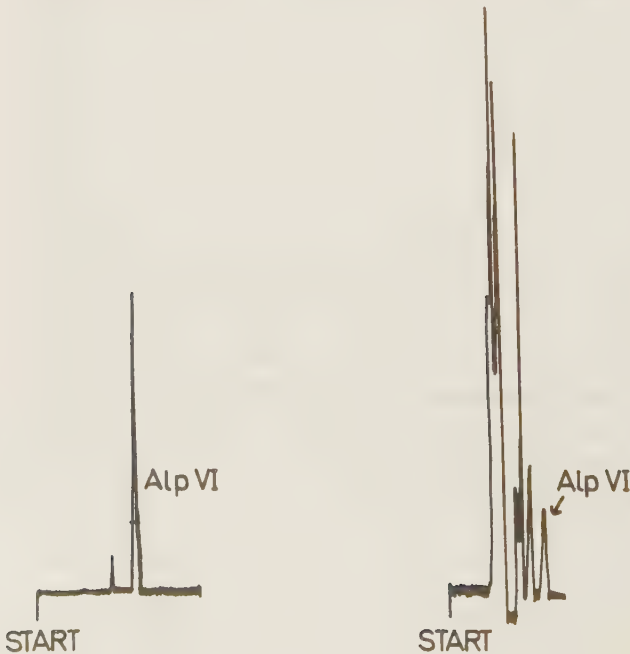


Abb.45: HPLC-Bestimmung von Alp VI

Tab. 8: Ergebnisse der HPLC-Gehaltsbestimmung von Alp VI in
der Rinde von *Rhamnus fallax*
Eichlösung: 1.0 mg Alp VI werden in 1 ml MeOH gelöst.

Einspritzung (μ l)		Peakfläche
Eichlösung	5	72426
	5	73544
	10	145752
	10	146227
Meßlösung	5	32386
	5	32625
	5	32135
	10	64751
	10	64487
	10	67702

Aus diesen Werten konnte ein Gehalt von 0.443% Alp VI
in der Rinde ermittelt werden.

Exkurs: Biosynthese der Anthra- und Naphthochinone

-Rubiaceentyp, Emodintyp, 8-Methylanthrachinontyp-

Die Biosynthesewege der Anthra- und Naphthochinone stehen in zweifacher Weise miteinander in Beziehung:

Erstens kommt es im Verlauf der Biosynthese der Anthrachinone ausgehend von der Shikimisäure intermediär zur Bildung von Naphthochinonen ^{55,56} (Abb.46). Dieser Weg der Anthrachinonbiosynthese führt zu einem Verbindungstyp mit überwiegend unsubstituiertem A-Ring (sog. Rubiaceentyp). Er kommt besonders in Rubiaceen, Bignoniaceen, Verbenaceen und Scrophulariaceen vor.

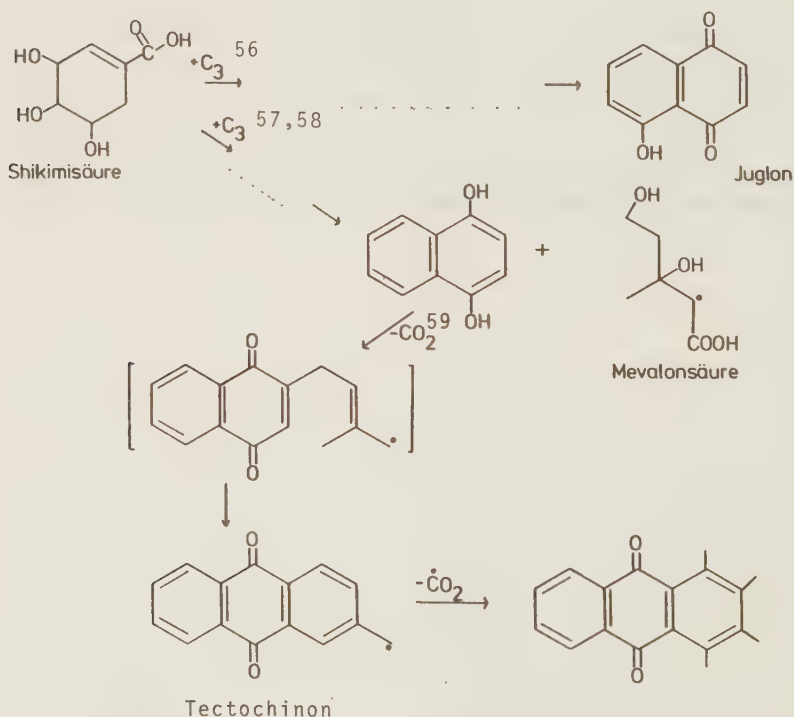


Abb.46: Biosyntheseweg von Naphthochinonen und Anthrachinonen über Shikimisäure (Rubiaceen-Typ)

Zweitens können sowohl Naphthochinone als auch Anthrachinone auf dem Acetatweg entstehen ⁵⁵ (Abb.47).

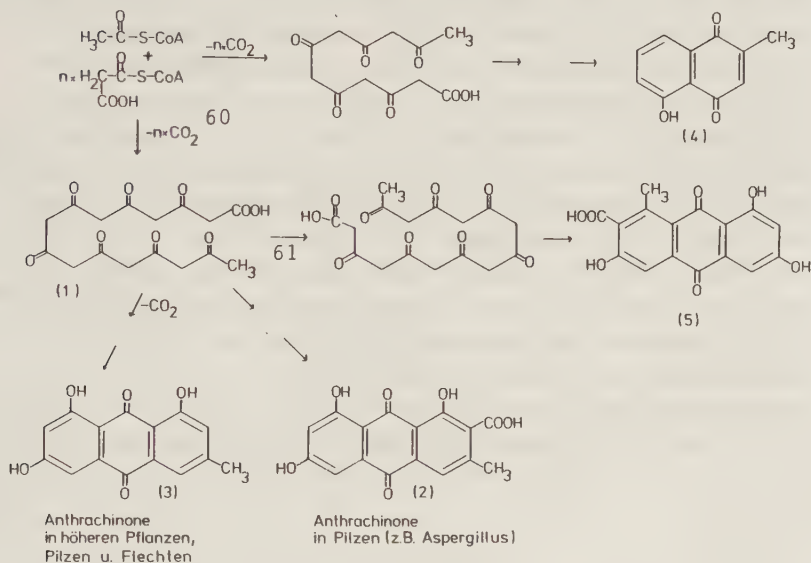


Abb.47: Bildung von Naphthochinonen und Anthrachinonen in höheren Pflanzen, Pilzen und Flechten auf dem Polyketidweg

(4) Plumbagin

(5) Laccainsäure D (=Xanthokermessäure)

Diese biogenetischen Zusammenhänge legen nahe, daß in den durch ihre Anthrachinonführung charakterisierten Rhamnus-Arten neben den Anthrachinonen auch Naphthochinone vorliegen können. In der Literatur ist allerdings das Vorkommen eines Naphthochinons in einer Rhamnus-Art bisher nicht beschrieben. Verschiedene Faltungsmechanismen der aus acht Acetat-

einheiten aufgebauten Polyketosäure (1) (Abb.47) ermöglichen die Entstehung unterschiedlich substituierter Anthrachinone bzw. Anthrachinoncarbonsäuren. Das Substitutionsmuster des Endocrocins (2) gilt als auf Pilze beschränkt. In höheren Pflanzen kommt es offensichtlich vor oder während der Zyklisierung der Polyketosäure zur Decarboxylierung. Verbindungen des Emodintyps (3) treten einerseits unter den Thallophyten bei vielen Aspergillaceen (z.B. Aspergillus-, Penicillium-, Claviceps-Arten) und in Flechten (z.B. Xanthoria-, Caloploca-Arten) andererseits in zahlreichen Magnoliophyticeen-Familien auf: Fabaceae (z.B. Andira), Caesalpiniaceae (z.B. Cassia), Rhamnaceae, Polygonaceae (Rheum, Rumex; Fagopyrum-Arten), Liliaceae (Aloe), Guttiferae (Hypericum). In vergleichbarer Weise werden Naphthochinone (4), z.B. Plumbagin (4) und Javanicin gebildet.

Verbindungen vom 8-Methyl-Anthrachinontyp sind im Pflanzenreich bisher erst einmal gefunden worden und zwar das Aloesaponarin I ⁴¹ aus Aloe saponaria (Liliaceae) (Abb.48).

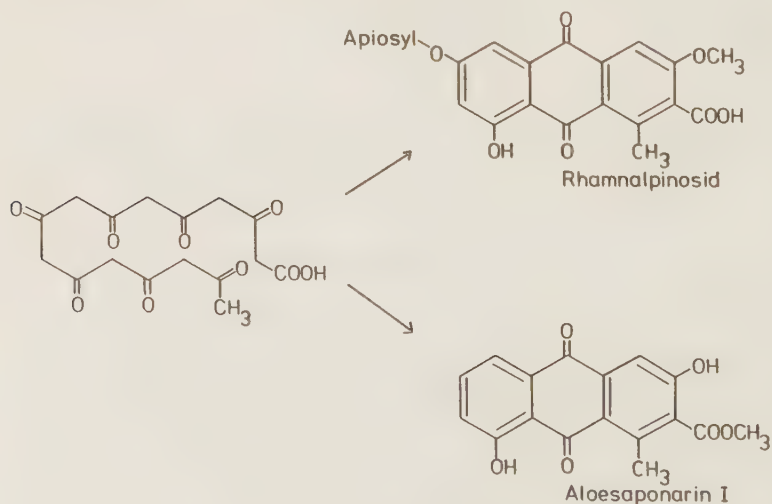
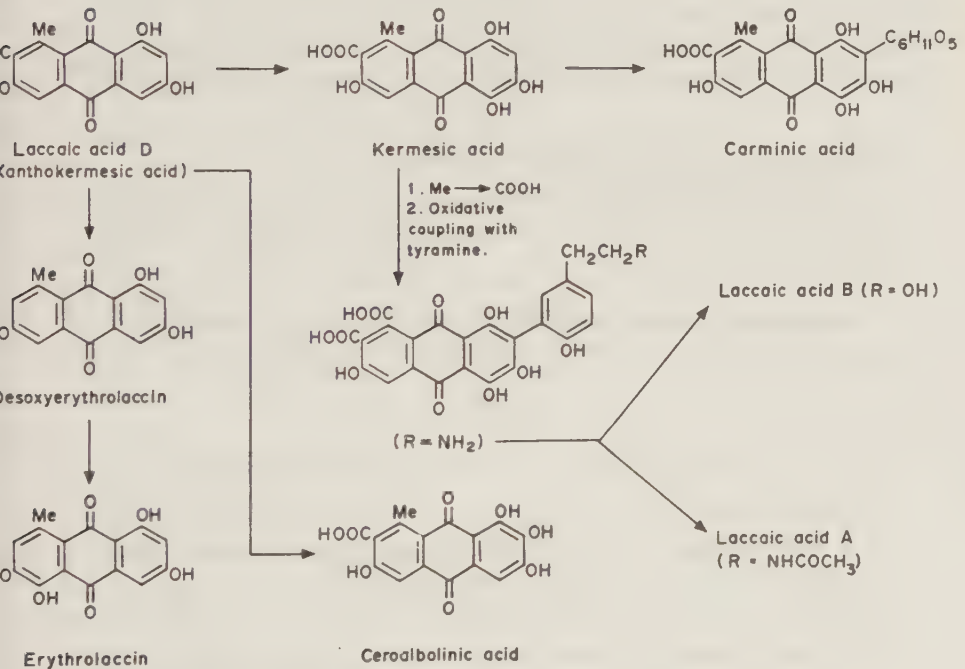


Abb.48: Faltung der Polyketosäure zur Bildung der bisher im Pflanzenreich gefundenen 8-Methyl-Anthraderivate

Die Laccainsäure D (5) gilt hingegen als Schlüsselverbindung in der Biosynthese verschiedener Insektenpigmente vom 8-Methyl-Anthrachinontyp, z.B. auch der sehr bekannten und als Farbstoff bzw. Färbungsreagenz verwendeten ⁶² Karminsäure (Abb.49).

Biosynthesis of some insect pigments derived from anthraquinone



4. Experimenteller Teil

4.1. Allgemeine Angaben

4.1.1. Chromatographie

- Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur DC wurden Kieselgel-Fertigplatten F₂₅₄ Merck der Größe 20x20 cm verwendet. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe einer Universal-UV-Lampe, Typ TL 900 der Firma Camag; die Emissionsmaxima lagen wahlweise bei 254 und 366 nm.

- Präparative Dickschichtchromatographie

Zur präparativen Dickschichtchromatographie wurden Kieselgel-Fertigplatten F₂₅₄ Merck der Größe 20x20 cm mit einer Schichtdicke von 2 mm verwendet.

Die Konzentrations- und Verhältnisangaben bei Fließmitteln beziehen sich auf Volumina (V/V).

- Detektion

Zur Detektion wurden folgende Sprühreagenzien verwendet :

a. 5%ige KOH-Lösung

5 g KOH werden in 30 ml destilliertem Wasser gelöst. Anschließend werden 70 ml Methanol zugefügt.

b. 5%ige AlCl₃-Lösung

5 g AlCl₃ werden in 30 ml destilliertem Wasser gelöst. Anschließend werden 70 ml Methanol zugefügt.

c. Anisaldehyd/Schwefelsäure-Lösung

Frisch bereitete Lösung von 0.5 ml Anisaldehyd in 50 ml Eisessig unter Zusatz von 1 ml Schwefelsäure (konz.).
(Nachbehandlung durch Erwärmen auf 100 - 105⁰ C)

- Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie wurden Glassäulen mit eingeschliffenen Glashähnen sowie als Füllmaterial Kieselgel Woelm (Korngröße 0.063-0.2 mm) und Polyamid Divergan^R SZ 9010 (F. BASF) verwendet.

- Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur HPLC wurde ein Gerät der Firma Knauer verwendet sowie ein Rechner und Drucker der Firma Shimadzu (C-R1A, Chromatopac).

- Gegenstromverteilungschromatographie (Droplet Counter Current Chromatographie, DCCC)

Es wurde der DCC-A der Firma Rikakikai Co. Ltd. Tokyo verwendet. Die Fraktionierung betrug 20 ml/h; die Fraktionen wurden dc überprüft. Die Fraktionen wurden in einem Fraction-collector 7000 Ultrarac der Firma LKB gesammelt. Das Probenrohr hatte wahlweise ein Fassungsvermögen von 10 bzw. 20 ml.

4.1.2. Spektroskopie

- UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/VIS-Absorptionsspektren wurden mit dem Zeiss Spektralphotometer PM Q II oder mit dem Varian Techtron 635 aufgenommen. Als Lösungsmittel für die Proben diente destilliertes Methanol. Es wurden Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke verwendet.

- IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren wurden mit einem Leitz-Unicam-SP-200-G Gerät aufgenommen. Zur Messung wurden KBr-Presslinge hergestellt (ca. 1 mg Probe/150 mg KBr).

- Massenspektroskopie

Die Massenspektren wurden mit einem Varian MAT CH-7A Massenspektrometer bei 70 eV und variablen Temperaturen aufgenommen.

Die hochauflösenden Massenspektren wurden mit einem Varian MAT 711/1787 bei 80 eV und variablen Temperaturen aufgenommen.

- ^1H -NMR-Spektroskopie

Die ^1H -NMR-Spektren wurden bei 60 MHz mit einem WP-60 und bei 270 MHz mit einem WM 250 Spektrographen der Firma Bruker aufgenommen. Als Lösungsmittel dienten CDCl_3 , Aceton- d_6 und DMSO-d_6 mit Tetramethylsilan als innerem Standard. Alle Angaben von ppm-Werten richten sich nach der δ -Skala.

- ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Die ^{13}C -NMR-Spektren wurden auf einem WM 250 Spektrographen der Firma Bruker bei 32.25 MHz (Alp V) aufgenommen. Als Lösungsmittel diente CDCl_3 mit TMS als innerem Standard. Alle Angaben von ppm-Werten richten sich nach der δ -Skala.

4.1.3 Schmelzpunktsbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Kofler-Heiztischmikroskop der Firma Reichert bestimmt (nicht korrigiert).

4.1.4. Bestimmung der optischen Drehung

Die optische Drehung wurde auf einem Polarimeter 141 der Firma Perkin-Elmer im Lösungsmittel Methanol gemessen.

4.1.5. Bestimmung des pH-Werts

Der pH-Wert wässriger Lösungen wurde mit einem Gerät der Firma Knick durchgeführt.

4.1.6. Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknungen wurden mit einem Gerät GT 2 der Firma Leybold Heraeus durchgeführt.

4.2. Isolierung von Alp I - Alp VI

4.2.1. Herkunft der Droge

Die untersuchte Droge *Rhamni fallacis Cortex* (Stammpflanze: *Rhamnus alpinus* ssp. *fallax*) wurde von der Firma Muggenburg, Hamburg, bezogen. Ihre Identität und Reinheit wurde mikroskopisch ⁴, dünnschichtchromatographisch ¹⁷ und durch den qualitativen Xanthorhamnin-Nachweis nach DAB 7 sichergestellt.

4.2.2. Isolierung der Substanzen Alp I - Alp V

1 kg Rindendroge wurde mit einer elektrischen Mühle fein vermahlen. Je 500 d Drogenpulver wurden mit je 3 l Diethylether im Soxhlet 3 Tage extrahiert. Die 6 l Etherfraktion wurden im Vakuum eingeengt. Dabei fielen ca. 30 g dunkelbrauner, amorpher Rückstand an. Je 10 g dieses fein vermahlenden Rückstands wurden in Methanol gelöst und auf eine mit 300 g Polyamid Divergan^R gefüllte Glassäule (ø: 8 cm; Länge: 110 cm) gegeben. Anschließend wurde mit Methanol eluiert. Die Alp I - Alp V enthaltenden Reagenzgläser mit Fraktionen zu je 15 ml wurden zu den Fraktionen 1 - 4 vereinigt:

Fraktion 1: Alp I (Rückstand nach Verjagen des Lösungsmittels
i. V.: 200 mg)

Fraktion 2: Alp II (280 mg)

Fraktion 3: Alp III und Alp IV (650 mg)

Fraktion 4: Alp V (200 mg)

Aus den Fraktionen 1, 2 und 3 konnten die noch stark verunreinigten Alp I, II und III nach erneuter Säulenchromatographie an Kieselgel 60 (100 g Kieselgel; Säule: $\varnothing$: 4 cm, Länge: 90 cm) mit Chloroform als Elutionsmittel rein erhalten werden. Die dabei aus Fraktion 3 anfallende Fraktion 3a (100 mg) mit noch verunreinigtem Alp IV wurde 3x mittels Säulenchromatographie gereinigt (Kieselgel 60: 2x80 g, 1x50 g; Säulen: $\varnothing$ 3 cm, Länge: 90 cm und $\varnothing$: 2cm, Länge: 90 cm; Eluens: Toluol).

Die Fraktion 4 enthielt verunreinigtes Alp V. Reinigungsversuche durch Umkristallisieren zeigten nicht den gewünschten Erfolg. Durch dreimalige Säulenchromatographie an Kieselgel 60 (je 70 g) mit Chloroform als Elutionsmittel (Säule: $\varnothing$: 3 cm, Länge: 90 cm) konnte schließlich reines Alp V erhalten werden.

4.2.3. Isolierung der Substanz Alp VI

Zur Isolierung der Verbindung Alp VI wurden zwei verschiedene Wege beschritten:

1.) 1600 g fein gepulverte Droge werden 3x am Ultraturax (nach Prof. P. Willems, F. Janke und Kinkel KG) mit je 3.5 l Wasser/Methanol (4:1) jeweils eine Stunde extrahiert (Kühlung im Eisbad). Der wässrige Extrakt wird auf 4 l im Rotationsverdampfer bei 60°C eingengt und anschließend 4x mit jeweils 2 l Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten Essigesterphasen werden i.V. eingengt. Der Rückstand (1.9g) wird mit Hilfe der Droplet Counter Current Chromatographie (DCCC) vorfraktioniert. Das Fließmittelsystem hierzu wird wie folgt hergestellt:

700 ml CHCl_3 , 1300 ml MeOH, 800 ml H_2O und 14 ml Ameisensäure werden in einem 5 l - Scheidetrichter gut durchgeschüttelt. Man läßt 2 h stehen, bis die Phasen vollständig getrennt sind. Das Verhältnis von Unterphase (UP) zu Oberphase (OP) beträgt 1 : 5. Die Unterphase findet als stationäre Phase im DCC-

Chromatographen Verwendung; die Oberphase wird als mobile Phase verwendet. Die Trennung erfolgt über 300 Glassäulen (Innen- $\varnothing$ 2 mm, Länge 40 cm). Die Probe (ca. 0.95 g) wird in 23 ml eines Gemisches aus OP und UP (5:1) gelöst. Anschließend wird filtriert und das Filtrat in ein 20 ml Probenrohr des DCC-Chromatographen gefüllt. Die Durchflußrate der mobilen Phase beträgt 20 ml/h. Der Fraktomat wechselt alle 50 min die Reagenzgläser; das Volumen jeder Fraktion beträgt ca. 17 ml. Die Fraktionen werden dc auf das Vorhandensein von Alp VI überprüft. Alp VI erscheint nach 25 h in der ersten Fraktion. Die Alp VI enthaltenden Fraktionen werden vereinigt; das Lösungsmittel i.V. verjagt. Nach 2 DCCC-Vorfraktionierungen zu je 0.95 g Probe wird der Alp VI enthaltende Rückstand (80 mg) erneut mit dem Fließmittelsystem $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (7:13:8) allerdings ohne Ameisensäure im DCCC fraktioniert. Alp VI erscheint nach 5 h ohne weitere Verunreinigungen. Die entsprechenden Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel i.V. verjagt. Der Rückstand wird in wenig Wasser gelöst, tiefgefroren und nach Gefriertrocknung resultieren 4 mg Alp VI.

2.) 800 g gepulverte Droge wurden mit Wasser durchfeuchtet und in ein Perkulationsrohr ($\varnothing$ 7.5 cm, Länge 110 cm) gefüllt. Anschließend wurde mit Wasser erschöpfend (DC-Kontrolle) perkoliert. Das Perkolat (insgesamt 10 l) tropfte direkt in Essigester. Das wäßrige Perkolat wurde dann noch 3x mit insgesamt 15 l Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten Essigesterphasen wurden i.V. eingengt auf 2 l. Diese 2 l wurden 3x mit je einem Liter Phosphatpuffer ausgeschüttelt. Der Phosphatpuffer (3 g $\text{NaHPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ und 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf 100 ml dest. Wasser) hatte einen pH-Wert von 7.4. Die Phosphatpufferlösung färbte sich während des Ausschüttelns rot (Phenolatbildung). Die Pufferlösung enthielt neben verschiedenen Begleitstoffen als Anthrachinon weitgehend nur Alp VI, während die anderen Anthrachinonglykoside in der Essigesterphase zurück-

blieben. Nach Ansäuern der Pufferlösung mit 2 n HCL aus pH 2, was sich äußerlich durch einen Farbumschlag von rot nach gelb bemerkbar machte, wurde diese Lösung 4x mit je 1.5 l Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten Essigesterphasen wurden i.V. zur Trockene eingeeengt. Der gelbbraune Rückstand (ca. 250 mg) wurde in wenig Essigester gelöst und mittels präparativer Dickschichtchromatographie aufgetrennt (Fließmittel: Essigester:MeOH:Wasser 77:13:10 + 2 Tropfen Essigsäure; Rf-Wert Alp VI : 0.25). Nach anschließender Gefrier-trocknung der Eluate der entsprechenden Kieselgelzonen konnten 20 mg Alp VI rein gewonnen werden.

4.3. Eigenschaften der Substanzen Alp I - Alp VI

4.3.1. Alp I = Chrysophanol

Ausbeute: 25 mg hellrotes, amorphes Pulver

Zusammensetzung: $C_{15}H_{10}O_4$

Molekulargewicht: 254.24

Schmelzpunkt: 194° - 196° C (Lit.[65] 196° C)

DC (Rf-Werte): Fließmittelsysteme nach Labadie

I. Toluol:Ethylformiat:Ameisensäure 75:24:1

II. Petrolether:Ethylacetat:Eisessig 90:5:5

I.: Rf-Wert: 0.76

EI-MS, 70 eV, 180° C, m/e (rel. Int.%): 254(100, $[M]^+$), 239(20, $[M-OH]^+$), 226(100, $[M-CO]^+$), 198(67, $[226-CO]^+$), 180(20), 152(75, $[180-CO]^+$), 141(47), 115(73), 92(38), 76(80), 69(100), 52(85)

IR (KBr, ν , cm^{-1}): 670, 690, 735, 805, 815, 840, 870, 900, 1000 sh, 1110 sh, 1160, 1175, 1210, 1270, 1290 sh, 1350 sh, 1375, 1455, 1475, 1560 sh, 1570, 1590 sh, 1605, 1630 (C=O chelat.), 1675 (C=O), 1735, 2860 (chelate OH), 2930 (chelate OH), 2950 sh

4.3.2. Alp II = Physcion

Ausbeute: 35 mg dunkelrotes, amorphes Pulver

Zusammensetzung: $C_{16}H_{12}O_5$

Molekulargewicht: 284.267

Schmelzpunkt: 205⁰- 206⁰C (Lit. [34] 207⁰C)

DC (Rf-Wert): Fließmittelsystem I (s.o.)

Rf-Wert: 0.72

EI-MS, 70 eV, 240⁰C, m/e (rel.Int. %): 284(100, M⁺), 254(95, [M-OCH₂]⁺), 256(12.5, [M-CO]⁺), 226(22, [254-CO]⁺), 198(14, [226-CO]⁺), 128(20), 69(25), 43(34)

IR (KBr, ν , cm⁻¹): 635, 665, 720, 755, 850, 875, 905, 930, 980, 1035, 1105, 1140, 1165, 1190, 1200, 1230, 1255, 1275, 1300, 1325, 1365, 1385, 1400 sh, 1455, 1480, 1570, 1600 sh, 1615 sh, 1630 (C=O, chelat.), 1675 (C=O), 2850 (chelate. OH), 2920 (chelate. OH), 2960 sh

4.3.3. Alp III = Emodin (=Frangula-Emodin)

Ausbeute: 85 mg hellrotes, amorphes Pulver

Zusammensetzung: $C_{15}H_{10}O_5$

Molekulargewicht: 270.24

Schmelzpunkt: 254⁰-255⁰C (Lit. [65] 256⁰C)

DC (Rf-Wert): Fließmittelsystem II (s.o.)

Rf-Wert: 0.43

EI-MS, 70 eV, 220⁰C, m/e (rel.Int. %): 270(100, M⁺), 253(6, [M-OH]⁺), 242(16, [M-CO]⁺), 214(13, [242-CO]⁺), 185(8), 168(7), 139(11), 115(8), 77(9), 69(12), 52(12)

IR (KBr, ν , cm⁻¹): 625, 650, 670, 725, 760, 820, 875, 910, 945, 1020 sh, 1035, 1100, 1130, 1160 sh, 1170, 1220, 1255 sh, 1270, 1305, 1330, 1370, 1385, 1415, 1445, 1455 sh, 1475, 1560, 1580, 1590 sh, 1615 sh, 1625

(C=O chelat.), 1665 (C=O), 2920 (chelate OH), 3060

4.3.4. Alp IV = Alaternin (=2-Hydroxyemodin)

Ausbeute: 15mg dunkelrotes, amorphes Pulver

Zusammensetzung: $C_{15}H_{10}O_6$

Molekulargewicht: 286.239

Schmelzpunkt: 305°C (Zersetzung) (Lit.[66] 310°C)

DC (Rf-Wert) : Fließmittelsystem II (s.o.)

Rf-Wert: 0.22

nach Besprühen mit KOH-Lösung Violettfärbung
(bei Alp I - III Rotfärbung)

EI-MS, 70 eV, 180°C, m/e(rel. Int.%): 286(100, M^+), 271(8, $[M-CH_3]^+$), 258(37, $[M-CO]^+$), 230(19.5, $[258-CO]^+$), 202(12, $[230-CO]^+$), 186(8, $[202-OH]^+$), 184(20), 155(22), 143(26), 126(22), 115(24), 92(21), 52(25)

1H -NMR (250 MHz/DMSO- d_6 /TMS/ppm): 12.1 s (2H, C-1- und C-8-OH), 9.91 s (1H, C-2-OH), 8.8 s (1H, C-6-OH), 7.53 s (1H, H-4), 7.15 d (1H, H-5, J=2.3 Hz), 6.6 d (1H, H-7, J=2.3 Hz), 2.31 s (3H, Ar- CH_3)

4.3.5. Alp V = 2-Methoxystypandron

Ausbeute: 10 mg gelbrote Plättchen ($CHCl_3$ /MeOH)

Zusammensetzung: $C_{14}H_{12}O_2$

Molekulargewicht: 260.06

Schmelzpunkt: 193-194°C

DC (Rf-Wert): Fließmittelsystem II (s.o.)

Rf-Wert: 0.43

Cyclohexan: CH_2Cl_2 :Ethylformiat:Ameisensäure

35:30:30:5

Rf-Wert: 0.7

Chloroform

Rf-Wert: 0.8

UV/VIS (MeOH/ $\lambda_{\max}$ /nm(ϵ)): 230 (11271), 289 (7332), 414 (2912)

IR (KBr, ν , cm^{-1}): 775, 805, 820, 880, 900, 910, 965, 990, 1010, 1030 ($-\text{OCH}_3$), 1070, 1105, 1120, 1175, 1195, 1245, 1260, 1285, 1310, 1335, 1350 sh, 1355, 1375 sh, 1380 sh, 1455, 1480, 1580 sh, 1595 ($\text{C}=\text{C}$), 1630 ($\text{C}=\text{O}$, chelat.), 1680 ($\text{C}=\text{O}$), 1700 ($\text{Ar}-\text{CO}$), 2860, 2925 (chelate. OH), 3050

EI-MS, 70 eV, m/e (rel.Int. %), 100°C : 260(40.5, M^+), 245(49.3, $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$), 231(14.1, $[\text{M}-\text{CHO}]^+$), 217(24.9, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{CO}]^+$), 189(5.4, $[\text{217}-\text{CO}]^+$), 174(6), 161(11), 64(10), 58(20), 43(100)

MS-Hochauflösung, 80 eV, 120°C : gef. 260.06876, ber. 260.06848
für $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_5$; gef. 245.04509, ber. 245.04500
für $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{O}_5$; gef. 231.06494, ber. 231.06574
für $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}_4$; gef. 217.04979, ber. 217.05001
für $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{O}_4$

^1H -NMR (250 MHz/ CDCl_3 /TMS/ppm) : 12.51 s (1H, C-5-OH), 7.52 s (1H, H-8), 6.16 s (1H, H-3), 3.96 s (3H, $-\text{OCH}_3$), 2.62 s (3H, $\text{Ar}-\text{COCH}_3$), 2.38 s (3H, $\text{Ar}-\text{CH}_3$)

^{13}C -NMR (32.23 MHz/ CDCl_3 /TMS/ppm): 207.4 (CH_3CO), 191.4 (C-4), 181.7 (C-1), 162.1 (C-2), 159.2 (C-5), 144.4 (C-7), 138.8 (C-9), 131.5 (C-6), 122.5 (C-8), 114.8 (C-10), 110.4 (C-3), 57.3 ($-\text{OCH}_3$), 31.3 (CH_3CO), 20.4 ($-\text{CH}_3$)

4.3.5.1. Etherspaltung von Alp Y zu Alp Ya

2-3 mg Alp Y wurden in 1 ml 1n K_2CO_3 -Lösung (methanol.) 45 Minuten bei $80^\circ C$ erwärmt. Anschließend wurde mit verdünnter HCl neutralisiert (Farbumschlag der Lösung von orangerot nach gelb) und das Spaltprodukt Alp Ya mit Diethylether ausgeschüttelt. Alp Ya konnte als rotes amorphes Pulver gewonnen werden.

4.3.5.2. Alp Va = 2-Hydroxystypandron

UV/VIS (MeOH/ λ_{max} /nm): 229, 292, 410

UV/VIS (MeOH/ OH^- / λ_{max} /nm) : 221, 269, 380, 480

1H -NMR (60 MHz/ $CDCl_3$ /TMS/ppm): 12.6 s (1H, C-5-OH), 7.5 s (1H, H-8)
6.18 s (1H, H-3), 2.58 s (3H, Ar-COCH₃) 2.37 s (3H, Ar-CH₃)

4.3.6. Alp VI = Rhamnalpinosid

Ausbeute: 24 mg rötliches, amorphes Pulver

Zusammensetzung: $C_{22}H_{20}O_{11}$

Molekulargewicht: 460.391

Schmelzpunkt: $215^\circ C$ (Zersetzung)

DC (Rf-Wert): Essigester:Methanol:Wasser 100:17:13

Rf-Wert: 0.15

UV/VIS (MeOH, λ_{max} , nm (ϵ)): 221.5 (7176), 310 sh, 284.5 (5765),
350 (789), 416 (710)

IR (KBr, ν , cm^{-1}): 910, 960, 990, 1025, 1080, 1100, 1120, 1165,
1230, 1260, 1320, 1380, 1390 sh, 1440, 1480,
1505, 1515, 1575 (C=C), 1600, 1630 (C=O, chelat)
1710 (COOH), 1725 sh, 1740 sh, 2850 (OH), 2920
(chelate. OH), 2950 sh

EI-MS, 80 eV, 450°C, m/e (rel.Int.%): 328(25), 284(100, [328-CO₂]⁺),
270(73, [284-CH₂]⁺), 253(24), 242(15, [270-CO]⁺),
214(10), 210(15), 186(7.6), 150(14), 142(19)

Hochauflösende MS, 80 eV, 450°C :

C₁₇H₁₂O₇ : gef. 328.0482187, ber. 328.0487264

C₁₆H₁₂O₅ : gef. 284.0680076, ber. 284.0683202

C₁₅H₁₀O₅ : gef. 270.0524672, ber. 270.0523565

Alp VI-acetat:

EI-MS, 80 eV, 300°C, m/e(rel.Int.%): 370(58, [328+CH₂CO]⁺), 368(100),
327/8(15), 284 (48, [328-CO₂]⁺), 270(32, [284-CH₂]⁺),
259(82, [Apiosyltriacetat]⁺)

Trimethylsilyl-Alp VI:

EI-MS, 80 eV, 450°C, m/e(rel.Int.%): 473(30, [328+2xTMS]⁺), 457(18),
415/6(50), 400/1(46, [473-TMS]⁺), 386(38), 369
(20, [Apiose+3xTMS]⁺), 343(100), 328(94, [401-
TMS]⁺), 295/6(20, [Apiose+2xTMS]⁺), 248(18,
[328-CO₂]⁺), 270(78, [284-CH₂]⁺)

¹H-NMR (270 MHz/DMSO-d₆/TMS/ppm/Apiosyl-H:Angaben in DMSO-d₆/
CF₃COOD): 12.97 s (1H, C-1-OH), 7.62 s (1H, H-5),
7.23 d (1H, H-4, J=2.5 Hz), 6.85 d (1H, H-2,
J=2.5 Hz), 5.69 d (1H, H-1', J=3.5 Hz), 5.61 s, br
(1H, Zucker-OH), 5.0 s, br (1H, Zucker-OH), 4.88
s, br (1H, Zucker-OH), 4.25 d (1H, H-2', J=3.5 Hz),
4.12 d (1H, H-4', J=9.5 Hz), 3.98 s (3H, -OCH₃),
3.81 d (1H, H-4'', J=9.5 Hz), 3.47 d (1H, H-5',
J=13 Hz), 3.40 d (1H, H-5'', J=13 Hz), 2.66 s
(3H, -CH₃)

Optische Drehung : Alp VI

2.06 mg Alp VI wurden in 1.3 ml Methanol gelöst ($\approx 0.158\%$).
Der gemessene Wert der optischen Drehung betrug -0.021 . Daraus ergibt sich:

$$[\alpha]_D^{20} = -13.29^\circ$$

$$[M]_D = \frac{\alpha_D \times \text{MG}}{100} = -61.13^\circ$$

4.3.6.1. Saure, hydrolytische Spaltung von Alp VI

4.3.6.1.1. Durchführung der Reaktion

5 mg Alp VI wurden in 5 ml destilliertem Methanol gelöst und mit 1 ml 1n HCl versetzt. Anschließend wurde 45 Minuten unter Rückfluß bei 80°C im Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen und Einengen i.V. zur Trockene wurde der Rückstand zwischen Wasser und Essigester verteilt. Die Wasserphase war farblos (Apiose), die Essigesterphase gelb gefärbt (Alp VIa).

4.3.6.1.2. Alp VIa (=Aglykon von Alp VI)

Ausbeute: 2 mg rotes, amorphes Pulver

DC (Rf-Wert) : Cyclohexan:CH₂Cl₂:Ethylformiat:Ameisensäure

35:30:30:5

Rf-Wert: 0.56

nach dem Besprühen mit KOH-Lösung schwache Rotfärbung

UV/VIS (MeOH, λ_{max} , nm) : 218, 283, 300 sh, 320 sh, 429

UV/VIS (MeOH/OH⁻, λ_{max} , nm): 215, 235 sh, 263, 310, 375,

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz/DMSO- d_6 /TMS/ppm): 12.97 s (1H, C-1-OH), 10.13 s (1H, C-3-OH), 7.8 s (1H, H-5), 7.23 d (1H, H-4, $J=2.5$ Hz), 6.85 d (1H, H-2, $J=2.5$ Hz), 3.98 s (3H, $-\text{OCH}_3$), 2.66 s (3H, $-\text{CH}_3$)

4.3.6.1.3. Apiose (Zuckeranteil von Alp VI)

DC (Rf-Wert): n-Butanol:Essigsäure:Ether:Wasser 9:6:3:1

Rf-Wert: 0.35

Detektion mit Anisaldehyd/Schwefelsäure/105°C:

Tageslicht : schwach braun

UV - 366 nm: hellgrün

4.3.6.1.4. Chemische Identifizierung der Apiose nach Sandermann⁴² durch Umsetzung mit

a. H_2SO_4

b. Fruktose + H_2SO_4

c. Fruktose + Cystein-HCl + H_2SO_4

Als Zuckerlösung findet jeweils die bei der sauren Hydrolyse von Alp VI angefallene Wasserphase Verwendung.

a. Unter Kühlung in Eiswasser werden 2.25 ml konz. H_2SO_4 /Wasser (6:1 V/V) vorsichtig zu 0.25 ml Zuckerlösung zugefügt. Diese Lösung wird 3 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt und anschließend unter fließendem Wasser gekühlt. Sofort danach wird die UV-Messung durchgeführt.

b. 0.25 ml Zuckerlösung und 0.25 ml einer wäßrigen Fruktoselösung (0.1% G/V) werden gemischt. Diese Mischung wird im Eiswasser gekühlt und 2.25 ml konz. H_2SO_4 /Wasser (6:1 V/V) werden vorsichtig so hinzugefügt, daß sich zwei Phasen bilden. Diese Phasen werden durch kräftiges Schütteln in Eiswasser gemischt. Die Mischung wird zunächst 2 Minuten in 20°C warmem

Wasser gehalten und anschließend 3 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Kühlung in 20°C warmem Wasser wird die Probe 10 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten bevor die UV-Messung durchgeführt wird.

- c. 0.25 ml Zuckerlösung werden wie unter b. behandelt. Nach dem 3-minütigen Erhitzen und Kühlen in 20°C warmem Wasser werden 50 µl einer wäßrigen Cystein-HCl-Lösung (3% G/V) unter Schütteln hinzugefügt. Nach 7-30 stündigem Aufbewahren bei Zimmertemperatur kann die UV-Messung durchgeführt werden.

4.3.6.2. Hydrolyse der Franguline A/B

10 mg eines Gemisches der Franguline A und B (F. Roth) wurden in 10 ml destilliertem Methanol gelöst und mit 2 ml 2n HCl versetzt. Anschließend wurde 45 Minuten bei 80°C im Wasserbad unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen und Einengen i.V. zur Trockene wurde der Rückstand zwischen CHCl_3 (gelb, Frangula-Emodin) und Wasser (farblos, Apiose und Rhamnose) verteilt.

Die wäßrige Phase wurde als DC-Vergleichslösung bei der Identifizierung der Apiose verwendet.

DC-Fließmittel: n-Butanol:Essigsäure:Ether:Wasser 9:6:3:1

Rf-Wert Apiose : 0.35

Rf-Wert Rhamnose : 0.43

4.3.7. Trennung der Franguline A und B mittels DCCC

Zum Vergleich der optischen Drehungen von Alp VI und Frangulin B (=Frangula-Emodin-6-O-apiofuranosid) wurde dieses isoliert, da die entsprechende Verbindung rein nicht zur Verfügung stand.

DCCC-Fließmittelsystem: CHCl_3 : MeOH : Wasser
5 10 6

Modus: aufsteigend (d.h. die Oberphase wurde als mobile Phase verwendet)

Trennsäulen: 200 (Innen-Ø 2 mm, Länge 40 cm)

Fraktionsvolumen: 17 ml/50 min

Reihenfolge des Erscheinens: Frangulin A vor B

Erstes Erscheinen von Frangulin A nach 60 Reagenzgläsern ($\approx 50h$)

Fraktionen:	61-74	74-81	82-93
	Frangulin A	A+B	Frangulin B

Probe: 20 mg eines Gemisches der Franguline A + B (F. Roth) wurden
in einem 1:1 Gemisch von Ober- und Unterphase gelöst und
in ein 5ml Probenrohr gefüllt.

DC-Kontrolle der Fraktionen:

Fließmittel: Essigester:MeOH:Wasser 77:13:10

Rf-Wert Frangulin A : 0.72

Rf-Wert Frangulin B : 0.79

4.3.8. HPLC-Gehaltsbestimmung von Alp VI

Bereitung der Untersuchungslösung siehe 3.3.

Gerätebedingungen

Säule: Lichrosorb -NH₂, 10 μ m

Fließmittel: Acetonitril 85

Wasser 15

Flußrate: 2 ml/min

Druck: 40 bar

Einspritz-

schleife: 20 μ l Schleife

Detektion: UV/VIS 430 nm

Absorb. Range: 0.16

Papiergeschw.: 5 mm/min

Retentionszeit Alp VI : 3.55 min

4.3.9. Qualitativer HPLC-Nachweis der Verbindungen Alp I - V, Alp VIa und Aloe-Emodin

Herstellung der Untersuchungslösungen:

Je 0.5 g fein gepulverte Droge wurden in 10 ml Lösungsmittel (Ether, Essigester bzw. Chloroform) 20 min unter Rückfluß erwärmt. Nach dem Abkühlen wurden die Extrakte filtriert und mit dem entsprechenden Lösungsmittel auf 10 ml aufgefüllt. Diese 10 ml wurden 3x mit jeweils 10 ml 1n NaOH-Lösung ausgeschüttelt. Die vereinigten NaOH-Ausschüttelungen wurden mit 2n HCl angesäuert und 3x mit jeweils 30 ml Essigester ausgeschüttelt. Die Essigesterphasen wurden vereinigt und das Lösungsmittel i.V. verjagt. Die dabei erhaltenen Rückstände der Essigester- bzw. Chloroformextrakte wurden in 10 ml MeOH aufgenommen, der Rückstand des Etherextrakts in 5 ml MeOH. Diese Methanollösungen dienten als Untersuchungslösungen.

Gerätebedingungen:

Säule :	RP 18, 7 μ m
Flußrate :	2 ml/min
Fließmittel :	MeOH:H ₂ O 60:40 $\longrightarrow$ 100:0
Druck :	40 bar
Einspritzmenge :	10 μ l
Absorb. Range :	0.16
Detektion :	UV/VIS 430 nm

Bei den Ether- und Essigesterextrakten wurde mit o.a. Fließmittelgradienten gearbeitet (nach jeweils 2 min plus 5 Teile MeOH). Beim Chloroformextrakt wurde als Fließmittel zunächst 6 Minuten das Gemisch MeOH:H₂O 60:40 verwendet und erst danach mit o.a. Gradienten gearbeitet.

5. Zusammenfassung und Diskussion

Wie in der Einleitung dargelegt, kam es in der vorliegenden Arbeit zum einen darauf an, die mengenmäßig vorherrschenden lipophilen Chinonpigmente der Fallaxrinde zu isolieren, zu identifizieren und sie aus chemotaxonomischer Sicht zu charakterisieren. Durch präparative Säulenchromatographie an Polyamid und mehrfacher Rechromatographie an Kieselgel gelang es, fünf Inhaltsstoffe zu isolieren und in reiner Form zu gewinnen. Drei der bereits in der Literatur beschriebenen Inhaltsstoffe wurden erneut isoliert, und zwar: Physcion, Chrysophanol und Emodin. Eine der identifizierten Verbindungen wurde erstmals als Inhaltsstoff der Fallaxrinde erkannt: Alaternin (= 2-Hydroxyemodin). Alaternin wurde somit als frei vorliegender Pflanzeninhaltsstoff nach seiner erstmaligen Identifizierung in der Kreuzdornrinde zum zweiten Mal aufgefunden. Im Verlaufe dieser Arbeit wurde über ein weiteres Vorkommen des Alaternins in der Rinde von *Rhamnus alaternus* berichtet. Das vikariierende Auftreten dieses Pigments in *Rhamnus*-Rindendrogen - es fehlt in den officinellen Rinden - interessiert als mögliches analytisches Unterscheidungsmerkmal zwischen den officinellen Drogen und ihren Verfälschungen *Rhamnus catharticus* und *Rh. fallax* (in *Rh. fallax* allerdings nur nach vorheriger Anreicherung des Extrakts nachweisbar !) wie auch als biochemisches Merkmal innerhalb der Gattung *Rhamnus*. Das in der Literatur beschriebene Vorkommen von Aloe-Emodin konnte aufgrund einer HPLC-Analyse unter Zuhilfenahme authentischer Vergleichssubstanz nicht bestätigt werden. Somit ist Aloe-Emodin nicht in Faulbaum-, Kreuzdorn- und Fallaxrinde enthalten, während es in der amerikanischen Faulbaumnrinde vorkommt, deren Hauptinhaltsstoffe sich vom Aloe-Emodinanthron ableiten und sich in der chemischen Zusammensetzung wesentlich von der der oben genannten Rinden unterscheidet. Eine der isolierten Verbindungen erwies sich überraschender-

weise als ein Naphthochinonderivat. Überraschend, weil ein Vorkommen von Naphthochinonen in Rhamnus-Arten bisher nicht bekannt ist. Die Struktur dieser bisher in der Literatur nicht beschriebenen Verbindung wurde vorwiegend mit spektroskopischen Methoden (UV/VIS, IR, MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) ermittelt. Die Stellung der Methoxygruppe im Chinonring wurde nach Überführung des Methoxyderivats in das entsprechende Hydroxyderivat und anschließender UV/VIS-spektroskopischer Analyse festgelegt. Danach konnte die Struktur als 6-Acetyl-5-hydroxy-2-methoxy-7-methyl-1.4-naphthochinon angegeben werden. Die Benennung der neuen Verbindung als 2-Methoxystypandron wurde von dem aus Stypandra-Arten (Liliaceae) bekannten Stypandron abgeleitet. Auffällig erscheint die chemische Verwandtschaft zu einem Vertreter der Familie der Rhamnaceen, *Ventilago viminalis*, in dem ebenfalls ein 2-Hydroxyjuglonderivat vermutet wird, dessen Konstitutionsaufklärung allerdings noch aussteht. Anhand der bekannten Biosynthesewege der Anthra- und Naphthochinone wurde in einer eigenen Darstellung deren gemeinsames Auftreten in *Rhamnus fallax* erklärt. Der Befund, daß es nunmehr gelungen ist, erstmals einen Naphthochinonvertreter aus einer Rhamnus-Art zu isolieren, paßt demnach sehr gut in das heutige Bild von diesen Naturstoffen.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit einem Problem, das im Zusammenhang mit der Analytik der Faulbaumrinde gemäß Ph.Eur. II steht. Die in der entsprechenden Monographie als Leitstoff der Fallaxrinde angesehene und bisher nur dünnschichtchromatographisch geortete Substanz konnte aus dem wäßrigen Perkolat gelagerter Droge nach Ausschütteln mit Ethylacetat, Verteilen zwischen Ethylacetat und Phosphatpuffer und Auftrennung an Kieselgel-PSC-Fertigplatten rein dargestellt werden.

Die Ermittlung der Struktur gelang überwiegend mit Hilfe spektroskopischer Daten (IR, UV/VIS, EI-MS, $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$, 2d NOE). Danach kommt dieser bisher nicht in der

Natur aufgefundenen Verbindung die Struktur einer 3-O-Apiofuranosyl-1.3-dihydroxy-6-methoxy-8-methyl-anthrachinon-7-carbonsäure zu. Als Name wird Rhamnalpinosid vorgeschlagen. Diese neue Struktur, nach Frangulin B das zweite aufgefundene Anthrachinonapiosid, ist gekennzeichnet durch einen ungewöhnlichen biogenetischen Bau ihrer ebenfalls bisher noch nicht beschriebenen Aglykonkomponente, nämlich dem 6-Methoxyderivat der sogenannten Xanthokermessäure. Das Substitutionsmuster weist zwar auf die Entstehung aus einer Polyketosäure hin, unterscheidet sich aber vom Emodintyp (B-C-Seitenkette) durch die α -Stellung der Methylgruppe. Dieser Strukturtyp konnte im Pflanzenreich bisher lediglich in *Aloe saponaria* mit dem nicht-glykosidischen Aloesaponarin nachgewiesen werden. Der biochemische Hintergrund des Auftretens eines 8-Methylanthrachinonderivats wird durch Vergleich der in der Literatur beschriebenen verschiedenen Faltungsmechanismen der Polyketosäure vom Emodintyp und dem hier gefundenen sowie dem Rubiaceentyp erhellt. Das Vorkommen von Rhamnalpinosid in der Fallaxrinde und das gleichzeitige Vorhandensein von Anthrachinonderivaten vom Emodintyp machen deutlich, daß diese Pflanze mit beiden Faltungsmechanismen arbeitet, während in den anderen *Rhamnus*-Arten eine der beiden Faltungsmöglichkeiten wahrscheinlich genetisch blockiert ist.

Im Gegensatz zum sehr seltenen Auftreten im Pflanzenreich steht das relativ häufige Vorkommen von 8-Methylanthrachinonen im Tierreich : Die Xanthokermessäure (= Laccainsäure D) hat hier eine Schlüsselposition innerhalb der Biosynthese verschiedener Insektenpigmente, deren bekanntester Vertreter die Karminsäure ist.

Kritische Betrachtungen zur Eignung von Rhamnalpinosid als Leitstoff der Fallaxrinde ergeben eindeutig, daß die wesentliche Eigenschaft der leichten Identifizierbarkeit nicht gegeben ist. Alternativ wird der dc Nachweis des Flavonol-

glykosids Xanthorhamnin zur sicheren Identifizierung der Fallaxrinde vorgeschlagen.

Hinsichtlich der Zuckerkomponente von Rhamnalpinosid, der Apiose, finden sich erstaunlicherweise bezüglich der Konfigurationszuordnung nur unvollständige und z.T. widersprüchliche Literaturangaben, die in einer eigenen Betrachtung dargestellt sind. Eine diesbezügliche ^1H -NMR-Auswertung gelingt trotz definierter Kopplungskonstanten nicht.

Die Tatsache, daß es sich beim Rhamnalpinosid um eine Anthrachinoncarbonsäure handelt, erklärt ihre große Polarität und damit ein entsprechendes chromatographisches Verhalten. Der Gehalt an Rhamnalpinosid in der Fallaxrinde wurde HPLC-analytisch mit 0.44% ermittelt. Zur Bestimmung des Gesamt-anthrachinongehalts ergaben Reihenuntersuchungen im Rahmen des phytochemischen Praktikums Werte von ca. 3.5% ber. als Glukofrangulin. Verschiedene Chargen zur Verfügung stehender Handelsware von officineller Faulbaumrinde wiesen ebenfalls Werte von 3-4% Gesamtanthrachinongehalt auf. Im quantitativen Gehalt an Hydroxyanthracenglykosiden unterscheiden sich Fallax- und Faulbaumrinde demnach offensichtlich nur unerheblich. Inwieweit qualitative Unterschiede vorliegen, ob insbesondere die wertvollen Glukofranguline in der Fallaxrinde vorkommen, muß ebenso wie die Untersuchung des sehr komplexen Anthraglykosidspektrums in dieser Droge einer weiteren Arbeit vorbehalten bleiben.

6. Literatur

1. SCHIER, W., Deutsche Apotheker Ztg. 121, 323, 1981
2. SCHILCHER, H., Deutsche Apotheker Ztg. 121, 1317, 1981
3. SCHORN, P.-J. in Ph. Eur. II Kommentar, Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2. Auflage, 1978
4. SCHIER, W., Deutsche Apotheker Ztg. 119, 527, 1979
5. WAGNER, H., Pharmazeutische Biologie Bd. 2, "Drogen und ihre Inhaltsstoffe", G.Fischer Verlag, Stuttgart, 1980
6. RAUWALD, H.W. u. H. Just, Arch. Pharm. 316, 399, 1983
7. RAUWALD, H.W. u. H. Just, Arch. Pharm. 316, 409, 1983
8. RAUWALD, H.W. u. H. Just, Planta med. 42, 244, 1981
9. RAUWALD, H.W., Z.f. Naturforsch. 38c, 170, 1983
10. FROHNE, D. u. U. Jensen, Systematik des Pflanzenreichs, G. Fischer Verlag, Stuttgart, 1973
11. A. ENGLER's Syllabus der Pflanzenfamilien Bd. II, Gebrüder Bornträger Verlag, Berlin-Nikolassee, 1964
12. HEGI, G., Illustrierte Flora von Mitteleuropa Bd. V, 1. Teil, J.F. Lehmanns Verlag, München, 1906
13. HASLER (Diss. Zürich 1936) zit. von Poethke u. Behrendt, Beiträge zur Biochemie u. Physiologie von Naturstoffen, K. Mothes-Festschrift, G. Fischer Verlag, Jena, 1965
14. HEGNAUER, R., Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. VI, Birkhäuser Verlag, Basel, 1973
15. POETHKE, W. u. H. Behrendt, Pharm. Zentralh. 104, 549, 1965
16. BENZINGER, F. u. J. Lehner, Deutsche Apotheker Ztg. 101, 627, 1961
17. HÖRHAMMER, L., H. Wagner u. H.P. Hörhammer, Deutsche Apotheker Ztg. 107, 563, 1967

18. Dissertation WEISGERBER, I., Bonn, 1966
19. WAGNER, H. u. G. Demuth, Tetrahedron Letters 49, 5013, 1972
20. WAGNER, H. u. G. Demuth, Z.f. Naturforsch. 29c, 204, 1974
21. WAGNER, H., S. Blatt u. E.M. Zgainski, Drogenanalyse, Springer Verlag Berlin - Heidelberg - New York, 1983
22. NAKANISHI, K., Infrared Absorption Spectroscopy, Nankodo Company Limited Tokyo, 1962
23. EVANS, F.J., M.G. Lee u. D.E. Games, Biomedical Mass Spectrometry Vol.6, No.9, 374, 1979
24. CHAN, A.W. u. W.D. Crow, Austr. J. Chem. 19, 1701, 1966
25. DEUTSCHMANN, F., B. Hohmann, E. Sprecher u. E. Stahl, Pharm. Biologie Bd. III, Drogenanalyse I: Morphologie u. Anatomie, G.Fischer Verlag, Stuttgart, 1979
26. HARBORNE, J.B., Phytochemical Methods, London, 1973
27. DINTER, H., R. Hänsele u. A. Pelzer, Z.f. Naturforsch. 35c, 154, 1980
28. COOKE, R.G. u. L.G. Sparraow, Austr. J. Chem. 18, 218, 1965
29. SHARMA, M., P. Sharma u. S. Rangaswami, Ind. J. Chem. 15b, 544, 1977
30. GÜNTHER, H., NMR-Spektroskopie, S.104, G.Thieme Verlag, Stuttgart, 1973
31. MOORE, R.E. u. P.J. Scheuer, J. Org. Chem. 31, 3272, 1966
32. WURM, G., U. Geres u. H. Schmidt, Arch. Pharm. 314, 861, 1981
33. TEZUKA, M., M. Kuroyanagi, K. Yoshihira u. S. Natori, Chem. Pharm. Bull. 20, 2029, 1972
34. THOMSON, R.H., Naturally Occuring Quinoids, London, 1971
35. BREITMAIER, E. u. G. Bauer, ¹³C-NMR-Spektroskopie, S. 60-70, G.Thieme Verlag, Stuttgart, 1977

36. KOBAYASHI, M., Y. Terni, K. Tori u. N. Tsuji, Tetrahedron Letters 8, 619, 1976
37. BREITMAIER, E. u. W. Voelter, ¹³C-NMR-Spektroskopie, S.156-158, Verlag Chemie, Weinheim, 1974
38. SINGH, I., R.T. Ogata, R.E. Moore, C.W. Chang u. P.J. Scheuer, Tetrahedron 24, 6053, 1968
39. BERGER, St. u. A. Rieker in: The chemistry of the quinoid Compounds (S. Patai, ed.), S.215, Part 1, John Wiley, London, 1974
40. STEGLICH, W., W. Lösel u. V. Austel, Chem. Ber. 102, 4104, 1969
41. YAGI, A., K. Makino u. I. Nishioka, Chem. Pharm. Bull. 22(5), 1159, 1974
42. SANDERMANN Jr., H., Phytochemistry Vol.8, 1571, 1969
43. VONGERICHTEN, E., Justus Liebigs Annln. Chem. 318, 121, 1906
44. aus: GRISEBACH, H., The biochemistry of plants, Vol.3, "Branched-chain Sugars: Occurrence and Biosynthesis", 1980
45. RANGANATHAN, R.M., S. Nagarajan, T.J. Mabry, Liu Yong-Long u. P. Neumann, Phytochemistry Vol.19, 2505, 1980
46. persönliche Mitteilung: H. GRISEBACH, 1984
47. STANEK, J., M. Cerny, K. Kocourek u. J. Pacak, The monosaccharides, Publishing House of the Czechoslovak Academy of sciences, Prague, 1963
48. KLYNE, W., Biochem. J. 47, XLI, 1950
49. GRISEBACH, H. u. R. Schmid, Angew. Chemie, 84. Jahrg.,5, 1972
50. HUEYALKAR, R.H., J.K.N. Jones u. M.B. Perry, Canadian J. of Chem., Vol. 43, 2085, 1965
51. RAUWALD, H.-W., Z.f. Naturforsch. 38c, 170, 1983

52. SCOTT, A.I., Interpretation of the UV-spectra of natural Compounds, Pergamon Press, Oxford London, 1964
53. HIGHET, R.J. u. E.A. Sokoloski, Structural Investigations of Natural Products
54. BÖHME, H. u. K. Hartke, Deutsches Arzneibuch 7.Ausgabe, Kommentar, Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Govi Verlag GMBH, Frankfurt, 1968
55. HÄNSEL, R., Pharmazeutische Biologie Allg. Teil, Springer Verlag, Heidelberg, 1980
56. LEISTNER, E. u. M.H. Zenk, Z.f.Naturforsch. 23b, 269, 1968
57. LEISTNER, E. u. M.H. Zenk, Z.f.Naturforsch. 22b, 865, 1967
58. LEISTNER, E. u. M.H. Zenk, Tetrahedron Letters No.5, 475, 1967
59. LEISTNER, E. u. M.H. Zenk, Tetrahedron Letters No.11, 1395, 1968
60. STEINEGGER, E. u. R. Hänsel, Lehrbuch der Pharmakognosie, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1965
61. YAGI, A., M. Yamamanouchi u. J. Nishioka, Phytochemistry 17, 895, 1978
62. MARTINDALE, The Extra Pharmacopoeia 28.Edition, Editor J.E.F. Reynolds, The Pharmaceutical Press, London, 1982
63. GAGDIL, D.D., A.V. Rama Rao u. K. Venkataraman, Tetrahedron Letters No.18, 2223, 1968
64. Dissertation LABADIE, Leiden
65. TSCHIRCH, A. u. H. Bromberger, Arch. Pharm. 249, 218, 1911
66. BRIGGS, L.H., F.E. Jacomb u. G.A. Nicholle, J. Chem. Soc. 3016, 1953
67. SCHNEIDER, G., Pharmazeutische Biologie, Zürich, 1975
68. HÜFLE, G., ¹³C-NMR-Spektroskopie chinoider Verbindungen, Tetrahedron 33, 1963, 1977
69. SPITELLER, G., Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen, Verlag Chemie Weinheim, 1966

7. Lebenslauf

- 18.03.1957 in Bremen geboren als einziges Kind des Kapitäns Johannes Miething und seiner Ehefrau Brigitte, geb. Brüggemann
- 1963 - 65 Besuch der Grundschule in Bremen
- 1965 - 72 Besuch der Grund- und Realschule auf Borkum
- 7.07.1972 Mittlere Reife
- 1972 - 75 Besuch des Max-Planck-Gymnasiums in Wilhelms-haven
- 12.05.1975 Abitur
- WS 75 - SS 76 Studium der physikalischen Ozeanographie in Kiel
- WS 76 - WS 80 Studium der Pharmazie in Berlin
- Mai 80-April 81 Praktisches Jahr in der Aesculap-Apotheke in Bremen-Vegesack
- 25.06.1981 Approbation als Apotheker
- seit Juli 81 Beschäftigung mit der vorliegenden Arbeit
- im SS 81 Lehrbeauftragter der FU Berlin
- seit 15.10.81 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakognosie und Phytochemie der FU Berlin

